

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe-  
Innenstadt

Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese

**Untersuchungen zur Rolle der Thyroidhormonrezeptoren bei  
der Proliferation von Mamma- und Ovarialkarzinomzellen  
unter Berücksichtigung von *BRCA1* Mutationen**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin  
an der medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Wese

aus

München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Falk Hlubek

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Doris Mayr

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian F. Reiser,  
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	MAMMAKARZINOM.....	1
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Risikofaktoren .....	1
1.2	OVARIALKARZINOM .....	2
1.2.1	Epidemiologie .....	2
1.2.2	Risikofaktoren .....	2
1.3	ERBLICHE FORMEN DES MAMMA- UND OVARIALKARZINOMS .....	3
1.4	BRCA1- MUTATIONEN .....	5
1.4.1	Genetik BRCA1 .....	5
1.4.1.1	Identifikation und Charakterisierung .....	5
1.4.1.2	Funktion .....	5
1.4.2	klinische Bedeutung .....	9
1.4.2.1	Entstehung eines Karzinoms aufgrund hereditärer BRCA1 Mutation .....	9
1.4.2.2	Häufigkeit eines BRCA1 assoziierten Karzinoms.....	9
1.4.2.3	Histologie des BRCA1 assoziierten Karzinoms .....	10
1.4.2.4	Genetische Diagnostik.....	11
1.4.2.5	Prävention und Therapie.....	12
1.5	NUKLEÄRE REZEPTOREN .....	13
1.5.1	Die Schilddrüsenhormone und ihre Rezeptoren.....	14
1.5.2	Rolle der Thyroidhormone und -rezeptoren bei der Karzinomentstehung.....	18
1.5.3	Einsatz von Thyroidhormonrezeptor-Antagonisten .....	20
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
3.1	ZELLINIEN .....	22
3.2	ZELLKULTUR .....	22
3.3	IMMUNZYTOCHEMIE .....	23
3.3.1	Herstellung der Objektträger für die Immunzytochemie .....	25
3.3.2	Durchführung der immunzytochemischen Färbungen.....	25
3.3.3	Schema Immunzytochemie .....	25
3.3.4	Auswertung der immunzytochemischen Färbungen .....	26
3.4	QUANTITATIVE RT-PCR .....	27
3.4.1	Isolation der Gesamt-RNA .....	29
3.4.2	Schema RNA-Isolation .....	30
3.4.3	Reverse Transkription der RNA in cDNA .....	31
3.4.4	Schema reverse Transkription.....	32
3.4.5	Durchführung der quantitativen RT-PCR .....	32

3.4.6	Schema quantitative RT-PCR .....	33
3.4.7	Auswertung der quantitativen RT-PCR .....	34
3.5	BRDU-ELISA .....	34
3.5.1	Durchführung des BrdU-ELISA .....	35
3.5.2	Schema BrdU-ELISA .....	36
3.5.3	Auswertung des BrdU-ELISAs.....	37
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>38</b>
4.1	ERGEBNISSE DER IMMUNZYTOCHEMIE .....	38
4.1.1	Thyroidhormonrezeptor $\alpha$ Proteinexpression bei Mammakarzinom-Zelllinien .....	38
4.1.2	Thyroidhormonrezeptor $\alpha$ Proteinexpression bei Ovarialkarzinom-Zelllinien .....	39
4.1.3	Thyroidhormonrezeptor $\beta$ Proteinexpression bei Mammakarzinom-Zelllinien .....	40
4.1.4	Thyroidhormonrezeptor $\beta$ Proteinexpression bei Ovarialkarzinom-Zelllinien .....	41
4.2	ERGEBNISSE DER QRT-PCR .....	42
4.2.1	Vergleich der Genexpression der Thyroidhormonrezeptoren bei HCC3153 und MCF7.....	42
4.2.2	Vergleich der Genexpression der Thyroidhormonrezeptoren bei UWB1.289 und OVCAR-3.....	43
4.3	ERGEBNISSE DES BRDU-ELISAS .....	43
4.3.1	Einfluss des Schilddrüsenhormons $T_3$ auf die untersuchten Zelllinien.....	44
4.3.1.1	Einfluss von $T_3$ auf Mammakarzinom-Zelllinien.....	44
4.3.1.2	Einfluss von $T_3$ auf Ovarialkarzinom-Zelllinien.....	45
4.3.2	Einfluss des Schilddrüsenhormons $T_4$ auf die untersuchten Zelllinien.....	46
4.3.2.1	Einfluss von $T_4$ auf Mammakarzinom-Zelllinien.....	46
4.3.2.2	Einfluss von $T_4$ auf Ovarialkarzinom-Zelllinien.....	47
4.3.3	Inhibierungsversuche mit Thyroidhormonrezeptor- Antagonisten .....	47
4.3.3.1	Einfluss des Thyroidhormonrezeptor-Antagonisten 1-850 auf die untersuchten Zelllinien.....	48
4.3.3.2	Einfluss des Thyroidhormonrezeptor $\beta$ Antagonisten H6039 auf die untersuchten Zelllinien.....	50
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>52</b>
5.1	EXPRESSION DER THYROIDHORMONREZEPTOREN .....	52
5.2	GENEXPRESSION DER HETERODIMERISIERUNGSPARTNER DER THYROIDHORMONREZEPTOREN .....	54
5.3	EINFLUSS DER SCHILDDRÜSENHORMONE AUF SPORADISCHE UND <i>BRCA1</i> MUTIERTE MAMMA- UND OVARIALKARZINOME .....	56
5.4	EINFLUSS DER THYROIDHORMONREZEPTOR-ANTAGONISTEN AUF SPORADISCHE UND <i>BRCA1</i> MUTIERTE MAMMA- UND OVARIALKARZINOMZELLEN .....	64
5.5	INTERAKTIONEN ZWISCHEN DEN THYROIDHORMONREZEPTOREN UND <i>BRCA1</i> .....	66
5.6	SCHLUSSFOLGERUNG .....	69
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>MATERIALLISTE.....</b>	<b>76</b>

9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	80
10	LITERATURVERZEICHNIS .....	82
11	DANKSAGUNG .....	91
12	LEBENS LAUF .....	92
13	PUBLIKATIONEN .....	93

# 1 Einleitung

## 1.1 Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Weltweit erkranken laut WHO jährlich etwa 1,2 Millionen Frauen am Mammakarzinom (WHO 2010). Es ist der häufigste tödlich verlaufende Tumor der Frau mit fast einer halben Million Todesfälle pro Jahr (GLOBOCAN-IARC 2008).

In Deutschland traten 2006 laut Statistiken des Robert-Koch-Institutes etwa 58.000 Neuerkrankungen am Mammakarzinom auf, wobei eine Erhöhung der Neuerkrankungsrate für die kommenden Jahre prognostiziert wurde. (Robert-Koch-Institut 2010). Das Risiko einer Frau, irgendwann im Leben an Mammakarzinom zu erkranken, wird auf 12 % geschätzt (Deutsche-Krebsgesellschaft 2008). Im Jahr 2006 verstarben in der Bundesrepublik über 17.000 Frauen am Mammakarzinom, wobei die Mortalitätsraten nach den Angaben des Robert-Koch-Institutes seit Mitte der 1990er Jahre rückläufig sind (Robert-Koch-Institut 2010). Der Rückgang der Letalitätsrate wird auf die verbesserten Früherkennungsmaßnahmen und den Einsatz adjuvanter systemischer Therapien zurückgeführt (Tumorzentrum-München 2009).

### 1.1.2 Risikofaktoren

Als Risikofaktoren gelten der frühe Eintritt der Menarche, Kinderlosigkeit, ein Alter über 30 bei Geburt des ersten Kindes, ein später Eintritt des Klimakteriums, die langjährige Einnahme von Hormonen in Form von Ovulationshemmern oder postmenopausaler Hormonersatztherapie (Robert-Koch-Institut 2010). Ein deutlich erhöhtes Risiko haben Frauen mit hereditärer Disposition für das Mammakarzinom, insbesondere wenn Mutationen im *BRCA1*- oder *BRCA2*-Genbereich vorliegen (FIGO 2000).

Da gegenwärtige antihormonelle Therapien bei *BRCA1* mutierten Mammakarzinomen meist wirkungslos sind, wird an der Entwicklung zielgerichteter Therapien geforscht. Den Hintergrund zu dieser Arbeit lieferten Beobachtungen an der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, wonach Patientinnen mit

*BRCA1* assoziierten Karzinomen häufiger an Dysregulationen des Thyroidhormonstoffwechsels litten. Somit war Ziel dieser Arbeit, die Wirkung der Thyroidhormone auf *BRCA1* assoziierte Tumorzellen in vitro zu untersuchen. Darüber hinaus sollte analysiert werden, welchen Effekt eine Inhibition der Thyroidhormonwirkung auf Rezeptorebene hat.

## **1.2 Ovarialkarzinom**

### **1.2.1 Epidemiologie**

Jedes Jahr erkranken nach Schätzungen der WHO weltweit über 200.000 Frauen am Ovarialkarzinom, etwa 140.00 Frauen sterben jährlich daran. Somit ist das Ovarialkarzinom der siebthäufigste maligne Tumor der Frau (GLOBOCAN-IARC 2008).

In Deutschland erkrankten 2006 ca. 9.700 Frauen am Ovarialkarzinom und 5640 Frauen starben daran. Obwohl die Neuerkrankungsrate nach Angaben des Robert-Koch-Instituts weiter ansteigt, ist die Mortalitätsrate seit den 1980er Jahren rückläufig (Robert-Koch-Institut 2010).

### **1.2.2 Risikofaktoren**

Man geht davon aus, dass die Erkrankung am Ovarialkarzinom mit hormonellen Einflüssen in Zusammenhang steht (Robert-Koch-Institut 2010). So steigern Hormonersatztherapien das Risiko, am Ovarialkarzinom zu erkranken. Nulliparität, früh einsetzende Menarche und später Eintritt ins Klimakterium sind Risikofaktoren, die ebenfalls auf langjährige hormonelle Einflüsse zurückgeführt werden. Daher gelten ununterbrochene Ovulationen und die damit verbundenen Gewebeverletzungen als Risikofaktoren. Die Einnahme hormoneller Ovulationshemmer scheint hingegen protektiv zu wirken (Tung, Wilkens et al. 2005). Besonders erhöht ist das Erkrankungsrisiko bei Frauen, deren Familienanamnese eine erbliche Disposition für das Ovarialkarzinom aufweist. Denn bei etwa 10 % der Ovarialkarzinomfälle liegt eine hereditäre Ursache zu Grunde, wobei davon zu 80 % Mutationen des *BRCA1*-Gens und zu 15 % Mutationen des *BRCA2*-Gens verantwortlich gemacht werden. (Tumorzentrum-München 2007).

### 1.3 erbliche Formen des Mamma- und Ovarialkarzinoms

In dieser Doktorarbeit wird vornehmlich das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom behandelt. Man geht davon aus, dass bei 5-10 % der Mamma- und Ovarialkarzinomfälle eine erbliche Disposition vorliegt (Tumorzentrum-München 2009) (Tumorzentrum-München 2007). Bis zu 15 % der weiblichen Bevölkerung hat mindestens eine vom Mammakarzinom betroffene Verwandte ersten Grades, was zu einer Verdoppelung des individuellen Brustkrebsrisikos führt. Als Ursache des erblichen Brustkrebses werden zum einen Defekte bei DNA-Reparaturgenen (Meindl, Hellebrand et al. 2010), zum anderen bestimmte, in der Bevölkerung häufiger verbreitete Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) vermutet (Stratton and Rahman 2008). So sind teilweise hoch penetrante Gene mit monogenem Erbgang verantwortlich und manchmal polygene Vererbungsmuster, bei denen Gene mittlerer und niedriger Penetranz eine Rolle spielen (Ripperger, Gadzicki et al. 2009). Zudem können Mamma- und Ovarialkarzinome im Rahmen von Syndromen auftreten, dazu siehe Abbildung 1. Bislang wurden zwei hoch penetrante Gene mit monogenem Vererbungsmuster identifiziert, die bei Mutationsträgern mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Mammakarzinom und in manchen Fällen zum Ovarialkarzinom führen. Sie werden als Brustkrebsgen1 (*BRCA1*) und 2 (*BRCA2*) bezeichnet und sind für 20-40 % der hereditär bedingten Mammakarzinome verantwortlich (Ripperger, Gadzicki et al. 2009). Mittlerweile wurde entdeckt, dass in seltenen Fällen auch monoallelische Mutationen von *RAD51C* hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinome verursachen (Meindl, Hellebrand et al. 2010). Als Brustkrebsgene mittlerer Penetranz gelten Mutationen der DNA-Reparaturgene *ATM*, *BRIP1*, *CHEK2*, *PALB2* und *RAD50*. Mutationen dieser Gene sind jedoch selten. Genomweite Assoziationsstudien haben Polymorphismen bei *FGFR2*, *TOX3*, *LSP1*, *MAP3K1*, *TGFB1*, 2q35 und 8q als Risikofaktoren mit niedriger Penetranz identifiziert. Sie treten bei einem größeren Teil der Bevölkerung auf (Ripperger, Gadzicki et al. 2009), und agieren teilweise bei *BRCA1/2* Trägern als Modifikatoren (Wang, Pankratz et al. 2010). Obwohl man durch genomweite Assoziationsstudien und Kopplungsanalysen versucht, weitere Brustkrebsgene zu finden, legen bisherige Erkenntnisse nahe, dass es neben *BRCA1/2* keinen weiteren monogenen Erbgang gibt, der für einen großenrelevanten Anteil des hereditären Brustkrebses verantwortlich ist. Vielmehr stützen bisherige Ergebnisse die These, dass das individuelle



Brustkrebsrisiko durch eine Vielzahl genetischer und umweltbedingter Faktoren bestimmt wird (Antoniou and Easton 2006).

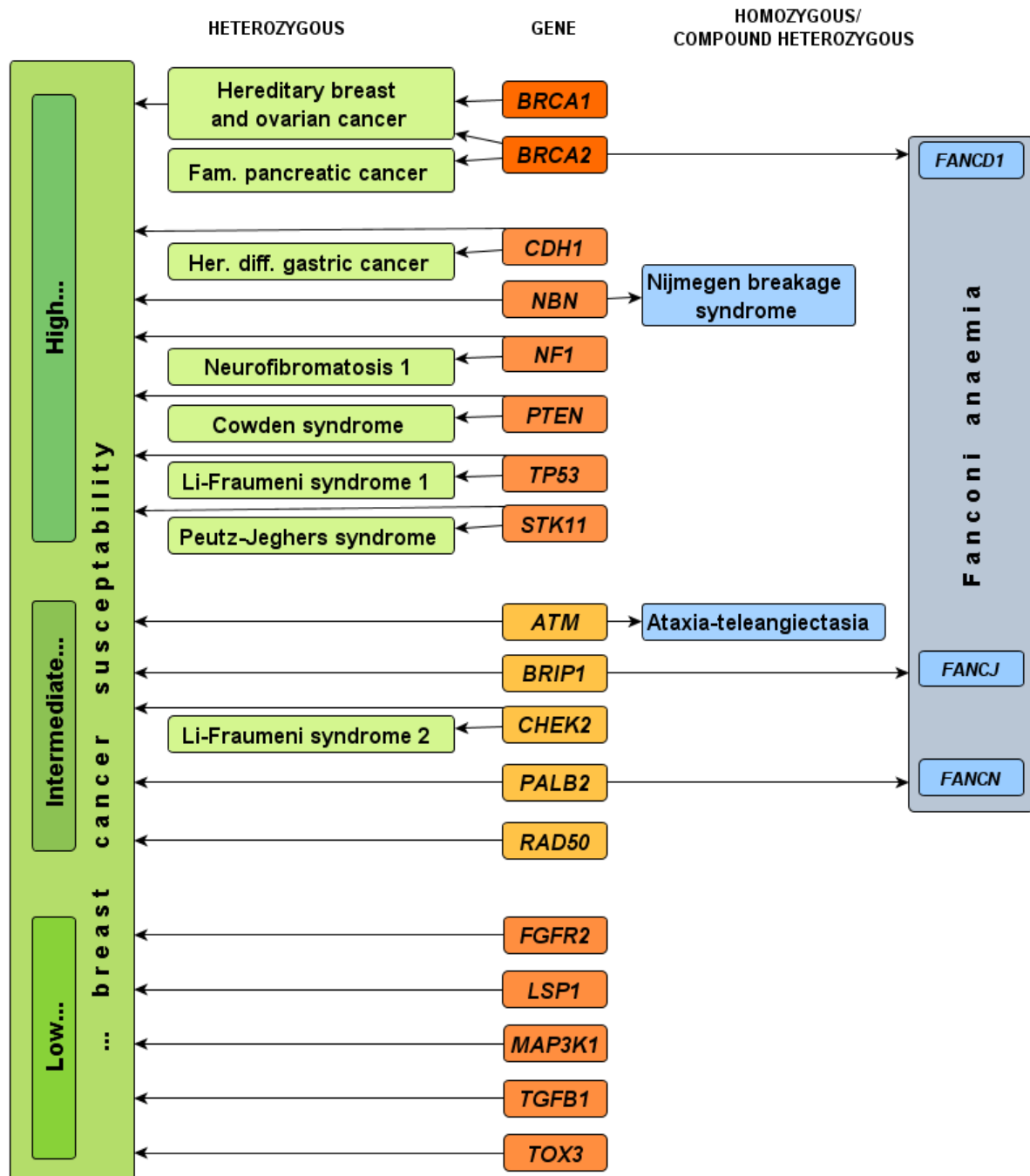


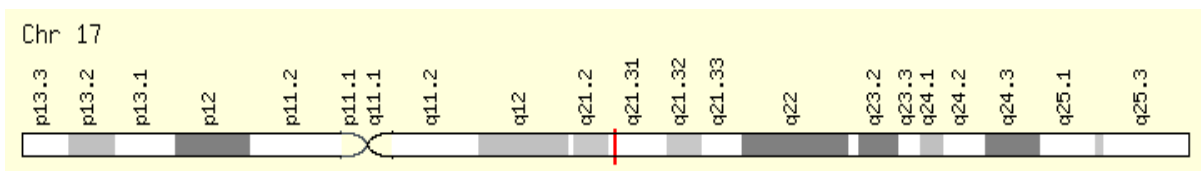
Abbildung 1 Defekte der oben dargestellten Gene steigern das Mamma-/Ovarialkarzinomrisiko und verursachen teilweise Syndrome (Ripperger, Gadzicki et al. 2009)

## 1.4 *BRCA1*- Mutationen

### 1.4.1 Genetik *BRCA1*

#### 1.4.1.1 Identifikation und Charakterisierung

Hall et al. entdeckten 1990, dass bei einigen Familien mit hereditärem Mamma- und Ovarialkarzinom Mutationen im Chromosomenabschnitt 17q21 vorliegen (Hall, Lee et al. 1990). Miki et al. identifizierten 1994 mithilfe positioneller Klonierung die Region 17q21 als *BRCA1*-Gen. Dieses Gen wird in mehreren Gewebearten exprimiert, darunter auch Mamma- und Ovarialgewebe (Miki, Swensen et al. 1994).



**Abbildung 2** Lokalisation des *BRCA1* Gens, dargestellt durch rote Markierung  
(Weizmann-Institute-of-Science 2012)

Laut Miki et al. besteht das *BRCA1*-Gen aus 22 kodierenden Exons, die sich über 100 kb genomischer DNA erstrecken. Das kodierte mRNA Transkript ist 7,8 kb breit und besteht aus 1863 Aminosäuren. Das N-terminale Ende enthält eine Zink-Finger Domäne (Miki, Swensen et al. 1994), das C-terminale Ende eine BRCT-Domäne (Bork, Hofmann et al. 1997). Laut Bork et al. treten BRCT-Domänen bei mehreren DNA-Reparaturgenen auf.

#### 1.4.1.2 Funktion

Seit das *BRCA1*-Gen Anfang der 1990er entdeckt wurde, wurde viel an seiner Funktion geforscht. Das *BRCA1*-Genprodukt ist ein großes Protein mit vielen funktionellen Domänen. Es steht in Wechselwirkung mit einigen anderen Proteinen, die an wichtigen biologischen Prozessen beteiligt sind (Deng 2006). Der Review von Narod und Foulkes liefert eine Übersicht über bisher bekannte Funktionen. Demnach spielt *BRCA1* eine Rolle bei der DNA-Reparatur (Scully, Chen et al. 1997), bei den Kontrollpunkten des Zellzyklus (Deng 2006), bei der Ubiquitinierung von

Proteinen (Hashizume, Fukuda et al. 2001) und beim Chromatin Remodeling (Bochar, Wang et al. 2000) (Narod and Foulkes 2004).

BRCA1 ist an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination beteiligt. Scully et al. fanden heraus, dass bei sich teilenden Zellen BRCA1 mit RAD51 im Zellkern assoziiert ist (Scully, Chen et al. 1997). RAD51 gilt als Schlüsselkomponente der homologen Rekombination (Narod and Foulkes 2004). Auch die Überempfindlichkeit von *BRCA1* mutierten Zellen auf Agenzien, die Doppelstrangbrüche in der DNA hervorrufen, bekräftigt die Annahme, dass BRCA1 bei der Doppelstrangreparatur eine Rolle spielt (Moynahan, Cui et al. 2001) (Murphy and Moynahan 2010). Hartman und Ford sind der Meinung, dass intaktes BRCA1 auch für die allgemeinen Reparaturmechanismen der DNA wichtig sei, da es die Transkription von Genen auslöse, die für die Nukleotid-Exzisions-Reparatur verantwortlich seien (Hartman and Ford 2002).

BRCA1 ist an den Kontrollmechanismen des Zellzyklus beteiligt (Deng 2006). Der korrekte Ablauf des Zellzyklus ist essenziell für die Unversehrtheit des Genoms. So kann sichergestellt werden, dass keine Mutationen entstehen, die die Wachstumskontrolle ausschalten. Bei Zellen mit abgeschalteter *BRCA1* Funktion (*BRCA1* knockdown) wurde festgestellt, dass die Expression einiger für den Zellzyklus und für dessen Kontrollpunkte wichtiger Gene herunterreguliert waren. So war während der Mitose-Phase der Kontrollpunkt, der im Normalfall die korrekte Trennung der Schwesterchromatide sicherstellt, fehlerhaft. Dadurch entstanden Defekte bei Zyto- und Karyokinese, welche wiederum die Entstehung von mehrkernigen Zellen förderten. Das stimmt mit Studien überein, die bei *BRCA1* mutierten Mammakarzinomen mehr Chromosomenanomalien als bei sporadischen Brustkrebsfällen feststellten (Bae, Rih et al. 2005) (Weaver, Montagna et al. 2002). Aufgrund dieser Erkenntnisse vermutet man, dass BRCA1 die Transkription von Zellzyklus-Kontrollgenen reguliert (Deng 2006). Narod und Foulkes vermuten, dass nicht der Verlust der korrekten *BRCA1* Funktion allein zur Tumorgenese führt, sondern die Inaktivierung eines Zellzyklus-Kontrollgenes hinzukommen müsse (Narod and Foulkes 2004).

Eine weitere Aufgabe von BRCA1 ist die Ubiquitinierung bestimmter Proteine. Ubiquitinierung bedeutet eine posttranslationale Modifikation, die die Proteinfunktion ändert (Monoubiquitinierung) oder das Protein für den Abbau durch das Proteasom markiert (Polyubiquitinierung) (Heine and Parvin 2007). Wu et al. entdeckten, dass das BRCA1-Transkript und das BARD1 Protein über ihre RING-Domänen interagieren (Wu, Wang et al. 1996). Fünf Jahre später konnten Hashizume et al. zeigen, dass das BRCA1-BARD1 Heterodimer aufgrund seiner RING-Domäne Ubiquitin-(E3)Ligase Aktivität besitzt. Mutationen in der RING-Domäne von *BRCA1* können zu Karzinomentwicklung führen, was einen Zusammenhang zwischen der Ubiquitinierungs- und der Tumorsupressorfunktion von BRCA1 nahelegt (Hashizume, Fukuda et al. 2001). Bisherige Erklärungsversuche zur BRCA1 Funktion geben keinen Aufschluss darüber, warum BRCA1 zwar in vielen Gewebstypen vorkommt, bei Mutationen jedoch in erster Linie Brust und Ovar karzinomgefährdet sind. Eakin et al. zeigten, dass die Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) vom BRCA1-BARD1 Heterodimer ubiquitiniert wird (Eakin, Maccoss et al. 2007). Bislang konnten Eakin et al. allerdings nur demonstrieren, dass ER $\alpha$  von BRCA1-BARD1 in vitro monoubiquitiniert wird. Es ist nicht bekannt, ob das Heterodimer ER $\alpha$  auch polyubiquitiniert. Es gibt Studien, die darauf hinweisen, dass BRCA1 die Transkription des ER $\alpha$  (Fan, Wang et al. 1999) und Progesteronrezeptors (PR) (Ma, Katiyar et al. 2006) reguliert. Somit könnte die BRCA1-BARD1 vermittelte Ubiquitinierung von ER $\alpha$  bedeuten, dass dies der Mechanismus für die Aktivierung der Transkription von ER $\alpha$  ist. Für diese Theorie spricht, dass ER $\alpha$  und PR ähnliche Expressionsmuster wie *BRCA1* mutierte Tumoren haben und dass Östrogenüberschuss als Risikofaktor für die Entwicklung eines Mamma- oder Ovarialkarzinoms gilt (Eakin, Maccoss et al. 2007).

Das Chromatin Remodeling erleichtert die Reparatur der DNA und tritt bei Doppelstrangbrüchen auf (Narod and Foulkes 2004). Auch hier ist BRCA1 involviert, da es an Komplexen beteiligt ist, die für den Chromatin Remodeling Prozess zuständig sind (Bochar, Wang et al. 2000) (Smeenk, Wiegant et al. 2010).

Zusammenfassend lässt sich über die Funktion von BRCA1 sagen, dass es aufgrund seiner Teilnahme an vielfältigen Reparatur- und Kontrollprozessen sowie der Interaktion mit einigen Reparaturproteinen als Teil der „DNA Damage Response“

zu sehen ist. *BRCA1* Mutationen führen demnach nicht sofort zur Tumorbildung, sondern verursachen genetische Instabilität, die ein erhöhtes Entartungsrisiko für die Zellen bedeutet (Deng 2006).

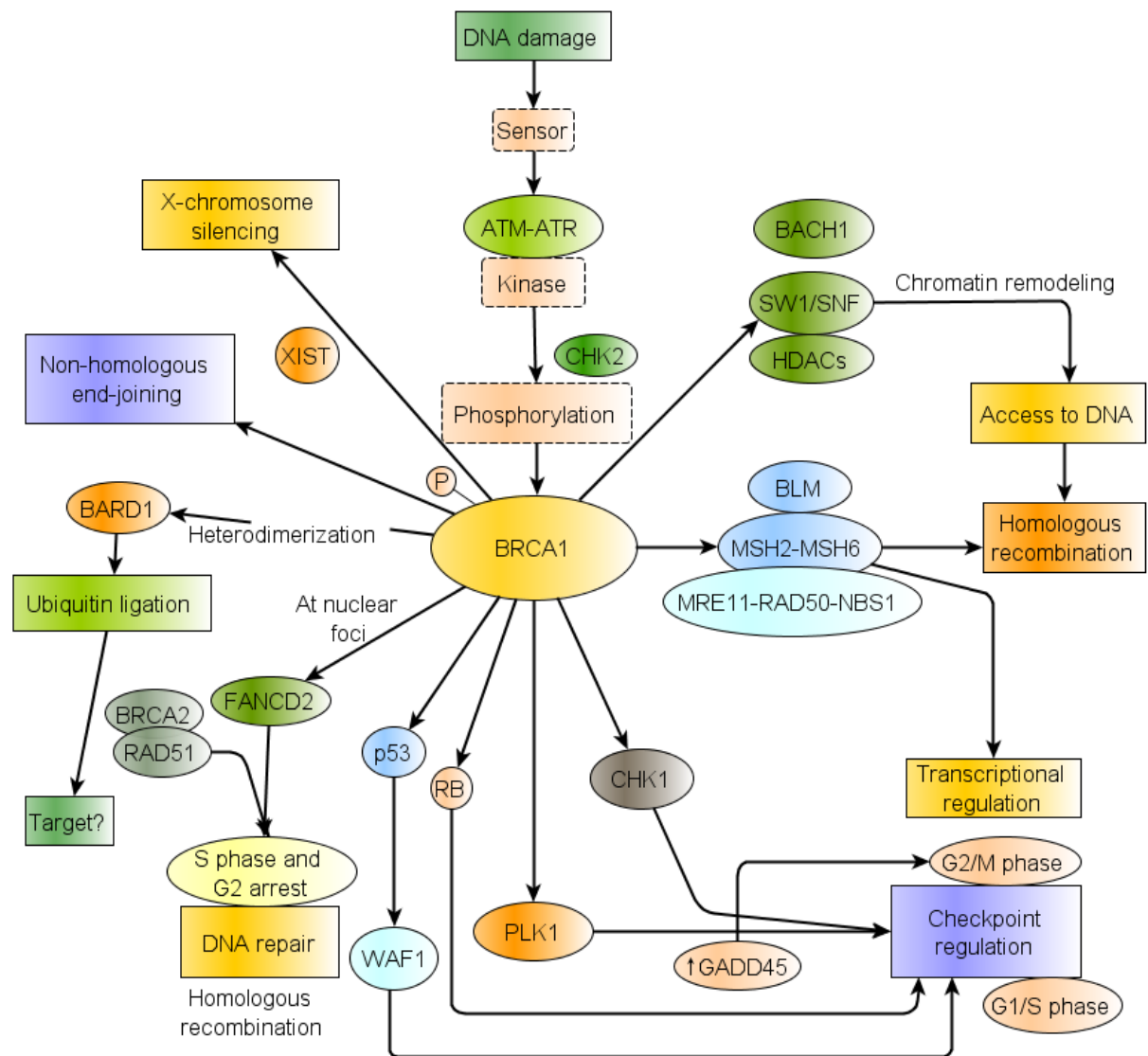


Abbildung 3 Schematische Übersicht zu den BRCA1 Funktionen (Narod and Foulkes 2004)

## 1.4.2 klinische Bedeutung

### 1.4.2.1 Entstehung eines Karzinoms aufgrund hereditärer *BRCA1* Mutation

Die Entstehung eines Mamma- oder Ovarialkarzinomes aufgrund *BRCA1*-assoziierter hereditärer Disposition wird nach dem Zweischnittmodell zur Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens nach Knudson erklärt (Knudson 1971) (Beckmann, Niederacher et al. 1997). Dabei wird im ersten Schritt die hereditäre Disposition in einem autosomal dominanten Erbgang vererbt. In der somatischen Zelle nimmt das mutierte Allel zunächst die Funktion eines rezessiven Allels ein. Dadurch ist zunächst die korrekte *BRCA1*-Funktion durch das gesunde Allel gesichert. Zur Ausprägung des malignen Phänotyps kommt es, wenn das gesunde Allel in der somatischen Zelle geschädigt wird und dadurch die Heterozygotie verloren geht (LOH) (Beckmann, Niederacher et al. 1997). In Übereinstimmung mit der Knudsonschen Hypothese kann man bei 90 % der Karzinome von *BRCA1*-Mutationsträgerinnen einen Verlust der Heterozygotie feststellen (Palacios, Robles-Frias et al. 2008). Auch bei Untersuchungen von in situ Läsionen oder von Gewebe der kontralateralen Brust wurde LOH im *BRCA1* Genbereich festgestellt. Somit kann scheinbar gesundes Gewebe schon eine gewisse Summe an genetischen Veränderungen in sich tragen, die zur malignen Transformation neigen. Man vermutet, dass der Verlust der Heterozygotie ein Ereignis ist, welches in der Frühphase der Tumorentstehung auftritt (Clarke, Sandle et al. 2006). Darüber hinaus konnte teilweise auch bei sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen ein Verlust der *BRCA1* Region nachgewiesen werden (Beckmann, Niederacher et al. 1997).

### 1.4.2.2 Häufigkeit eines *BRCA1* assoziierten Karzinoms

Etwa 5-10 % der Mamma- und Ovarialkarzinome sind hereditär bedingt. Davon geht ca. die Hälfte der Fälle auf *BRCA*-Mutationen zurück (Tumorzentrum-München 2009) (Tumorzentrum-München 2007). Das Risiko für *BRCA1*-Mutationsträgerinnen, bis zum 70. Lebensjahr am Mamma- bzw. Ovarialkarzinom zu erkranken, wird mit 65 % für das Mammakarzinom bzw. 39 % für das Ovarialkarzinom angegeben (Antoniou, Pharoah et al. 2003). In Familien mit vielen Er-

krankungsfällen liegt das Risiko höher, was einen Einfluss modifizierender Faktoren und des Lebensstils nahelegt. *BRCA1* assoziiertes Mammakarzinom tritt verglichen mit der sporadischen Form zwei Lebensdekaden früher auf und betrifft damit auch sehr junge Frauen ab ca. 20 Jahren. Da Männer viel seltener erkranken (gender effect), geht man von einer unvollständigen Penetranz des sonst als autosomal dominant eingestuften Erbgangs aus (Meindl, Ditsch et al. 2011). Der Anteil der *BRCA1* mutierten Karzinome variiert nach ethnischer Zugehörigkeit. In einigen Ländern sind Gründer-Mutationen von *BRCA1* beschrieben worden. Besonders stark sind ashkenasische Juden davon betroffen, bei denen einzelne Gründer-Mutationen bei bis zu 1 % der Volksgruppe auftreten (van der Groep, van der Wall et al. 2011).

#### **1.4.2.3 Histologie des *BRCA1* assoziierten Karzinoms**

Histopathologisch zeigen sich zwischen sporadischen und *BRCA1* assoziierten Mammakarzinomen einige Unterschiede. Zwar sind auch *BRCA1* assoziierte Mammakarzinome meist invasive duktile Adenokarzinome (74 %), der medulläre Typ (13 %) tritt jedoch häufiger auf als beim sporadischen Mammakarzinom (van der Groep, van der Wall et al. 2011). *BRCA1* assoziierte Tumore zeichnen sich durch sehr invasives, schnelles Wachstum mit geringem Differenzierungsgrad (Grad 3) der Tumorzellen aus (Tumorzentrum-München 2009). Charakteristischerweise ist der Rezeptorstatus von *BRCA1* mutierten Tumoren „triple negative“, d.h. ER, PR und HER2/neu werden nicht exprimiert. Die Expression von p53 ist meist stark erhöht (Palacios, Robles-Frias et al. 2008). Aufgrund ihres Genexpressionsprofils passen *BRCA1* assoziierte Karzinome zum von Perou definierten basalen Phänotyp (Perou, Sorlie et al. 2000). Immunhistochemische Untersuchungen ergaben, dass die Expression basaler Zytokeratine (CK 5/6 und CK14) bei *BRCA1* assoziierten Mammakarzinomen erhöht ist. Da der Immunphänotyp von *BRCA1* assoziierten Mammakarzinomzellen und von Bruststammzellen ähnlich ist, vermutet man, dass es sich bei ersteren um eine Form von Vorläuferzellen handelt (van der Groep, van der Wall et al. 2011).

Beim *BRCA1* mutierten Ovarialkarzinom tritt der seröse Subtyp deutlich häufiger auf als beim sporadischen Ovarialkarzinom. Seröse Adenokarzinome gelten als

aggressiver als die muzinöse Form und treten häufiger beidseitig auf (Petrucelli, Daly et al. 2010).

Trotz zahlreicher Indizien ist nicht eindeutig geklärt, ob sich die Prognose eines *BRCA1* assoziierten Mamma- oder Ovarialkarzinoms von der Prognose sporadischer Formen unterscheidet (Palacios, Robles-Frias et al. 2008).

#### 1.4.2.4 Genetische Diagnostik

Bei Verdacht auf familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom kann in Deutschland ein Gentest auf *BRCA1* und 2 Mutationen durchgeführt werden. Dazu müssen die in Abbildung 4 dargestellten Kriterien erfüllt sein.

##### Kriterien zur Durchführung einer Genanalyse der Brustkrebsgene

*BRCA1* und *BRCA2* bei einer Indexperson der Familie (S3-Leitlinie, 2008)

- mindestens zwei Familienangehörige an Brust- oder Eierstockkrebs erkrankt, davon mindestens eine Betroffene jünger als 51 Jahre bei der Erstdiagnose
- mindestens drei Angehörige mit Brustkrebs, unabhängig vom Alter bei Erstdiagnose
- eine Angehörige im Alter von 36 Jahren oder jünger an Brustkrebs erkrankt
- eine Angehörige mit beidseitigem Brustkrebs im Alter von 51 Jahren oder jünger
- Familie mit Brust- und Eierstockkrebs bei einer oder mehreren Angehörigen
- ein männlicher Verwandter mit Brustkrebs und eine Frau mit Brust- oder Eierstockkrebs

**Abbildung 4** Kriterien für einen *BRCA*-Gentest (Meindl, Ditsch et al. 2011)

Die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses ist abhängig von der in der Familie auftretenden Erkrankungsrate, dem Ersterkrankungsalter und den betroffenen Organen (Mamma/Ovar) (Meindl, Ditsch et al. 2011). Bei einem positivem Ergebnis können präventive Maßnahmen eingeleitet werden, die den Ausbruch der Erkrankung verhindern oder zumindest verzögern (Schwartz, Isaacs et al. 2011).



#### 1.4.2.5 Prävention und Therapie

In Deutschland werden Frauen, bei denen eine *BRCA* Mutation nachgewiesen wurde, in ein multimodales Früherkennungsprogramm eingebunden. Dazu wird alle sechs Monate eine Tastuntersuchung und Sonographie der Brust durchgeführt. Zusätzlich erfolgt etwa ab dem 25. Lebensjahr eine jährliche Mammographie und Kernspintomographie (Meindl, Ditsch et al. 2011). Als weitere Präventionsmaßnahme sind prophylaktische Operationen möglich, deren Wirksamkeit in mehreren klinischen Studien nachgewiesen wurde (Rebbeck, Friebel et al. 2004) (Domchek, Friebel et al. 2010). Eine prophylaktische beidseitige Mastektomie (PBM) senkt das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, um etwa 95 %, eine prophylaktische beidseitige Salpingo-Oophorektomie (PBSO) senkt das Ovarialkarzinomrisiko um etwa 97 % und zusätzlich das Brustkrebsrisiko um etwa 50 %. In Deutschland werden prophylaktische beidseitige oder kontralaterale Mastektomien bei bereits aufgetretenem unilateralem Mammakarzinom auf Wunsch der Patientin durchgeführt (Meindl, Ditsch et al. 2011). Prophylaktische beidseitige Salpingo-Oophorektomien werden Patientinnen zwischen 35 und 40 Jahren nach abgeschlossener Familienplanung ausdrücklich empfohlen, da die Screeningmethoden für das Ovarialkarzinom nicht sensitiv genug sind und ein Ovarialkarzinom im fortgeschrittenem Stadium eine sehr schlechte Prognose aufweist (Nathanson and Domchek 2011).

Die Therapie *BRCA1* assoziierter Karzinome orientiert sich an den für sporadische Mamma- und Ovarialkarzinome gültigen Richtlinien (Tumorzentrum-München 2007) (Tumorzentrum-München 2009).

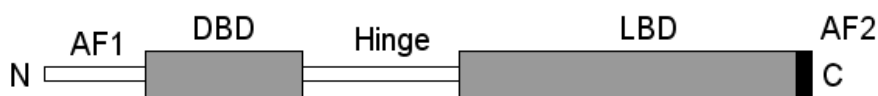
Mittlerweile sucht man jedoch nach geeigneten Therapie- und Präventionsmöglichkeiten auf molekularer Ebene. Wirksamkeit zeigten bisher DNA interkalierende Substanzen wie Platinderivate (Byrski, Gronwald et al. 2010) und Inhibitoren der Poly-ADP-ribose-Polymerase (PARPi) (Audeh, Carmichael et al. 2010). So hilft die Poly-ADP-ribose-Polymerase (PARP) im Normalfall bei der Reparatur von Einzelstrangdefekten. Bei *BRCA* mutierten Tumorzellen ist die homologe Rekombination defekt. Folglich können bei einer zusätzlichen Inhibition der Poly-ADP-ribose-Polymerase die bei den Replikationen angehäuften Doppelstrangbrüche nicht mehr repariert werden und die Apoptose der Tumorzellen wird eingeleitet (Sandhu, Yap et al. 2011). Da jedoch nur etwa 40 % der *BRCA* assoziierten Tumore auf

PARPi ansprechen (Nathanson and Domchek 2011), muss nach weiteren zu Prävention und Therapie geeigneten Substanzen gesucht werden.

## 1.5 Nukleäre Rezeptoren

Nukleäre Rezeptoren (NR) sind in ihrer Rolle als Transkriptionsfaktoren wichtig für die Embryonalentwicklung, die Zelldifferenzierung und die Kontrolle des Stoffwechsels (Jin and Li 2010). Fehlfunktionen ihres Signalsystems können proliferative, reproduktive und metabolische Krankheiten wie Krebs, Infertilität, Adipositas und Diabetes auslösen (Gronemeyer, Gustafsson et al. 2004). Die evolutionär verwandte Superfamilie der nukleären Rezeptoren wird klassischerweise in drei verschiedene Rezeptortypen eingeteilt (McKenna and O'Malley 2002). Typ I Rezeptoren sind Steroidrezeptoren, die sich im ungebundenen Zustand im Zytosol befinden und bei Ligandenbindung in den Kern translozieren, wo sie als Homodimere an die DNA binden. Typ II sind Nicht-Steroidrezeptoren, die nach der klassischen Auffassung auch im ungebundenen Zustand im Kern verbleiben und meist als Heterodimere mit dem RXR-Rezeptor an die DNA binden. Zu diesem Rezeptortyp zählen die Retinsäure-, Thyroidhormon- und Vitamin D Rezeptoren. Typ III werden als „orphan receptors“ bezeichnet. Diese besitzen entweder keinen Liganden oder es wurde noch keiner identifiziert (McKenna and O'Malley 2002). Bislang wurden 48 humane Kernrezeptoren identifiziert, bei 24 sind Liganden bekannt (Reschly and Krasowski 2006) (Sladek 2011). Nukleäre Rezeptoren besitzen in der Regel fünf funktionale Domänen (siehe Abb.5) (Jin and Li 2010) (Li, Ai et al. 2010). N-terminal liegt die Aktivierungs-Funktion 1 (AF-1) Domäne, zentral die DNA-Bindungsdomäne (DBD) und die Scharnierregion (Hinge), welche die DBD mit der Ligandenbindungsdomäne (LBD) verbindet. Am C-Terminus ist die Aktivierungs-Funktion 2 (AF-2) Domäne lokalisiert. AF-1 moduliert gewebs- und promotorspezifisch die Transkription. Die DBD kann Promoter erkennen und die DNA am Hormon responsiven Element (HRE) binden. Die LBD hat Bindungsstellen für Liganden, Coregulatoren und für die Dimer-Bildung. Die Aktivität der nukleären Rezeptoren wird durch lipophile Botenstoffe reguliert, die von spezialisierten Zellen in den Extrazellularraum sezerniert werden und von dort an Transportproteine gebunden zu den Zielzellen gelangen. Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften können die Signalmoleküle leicht durch die Plasmamembran in die Zelle diffundieren (Lodish

2000). Wenn das Hormon seinen Rezeptor gebunden hat, erfolgt eine Konformationsänderung des nukleären Rezeptors (Torchia, Glass et al. 1998) (Li, Ai et al. 2010). Das löst zum einen die Dissoziation des zuvor am nukleären Rezeptor gebundenen Corepressors, zum anderen die Bindung von Coaktivatoren aus. Der Komplex kann dann an spezifische Promotorregionen responsiver Gene (Enhancer/Silencer) binden und deren Transkription aktivieren oder reprimieren. Die Anzahl nukleärer Rezeptoren in den Zellen ist beschränkt, d.h. bei steigenden Ligandenkonzentrationen kann die Transkription bestimmter Gene dadurch eingeschränkt werden, dass ein Sättigungseffekt auftritt (Löffler, Petrides et al. 2007). Neben den Liganden spielen die Coregulatoren eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription durch nukleäre Rezeptoren. Sie erlauben den Rezeptoren große funktionale Flexibilität, können aktivierend sowie reprimierend wirken. Man vermutet, dass sie auch für die unterschiedlichen Wirkungen bestimmter Hormone auf verschiedene Gewebearten und Rezeptorsubtypen verantwortlich sind (McKenna and O'Malley 2002). Daraus ist die Idee entstanden, nur bestimmte Funktionen eines nukleären Rezeptors durch (Ant)agonisten zu modulieren beziehungsweise Liganden einzusetzen, die gewebsspezifisch agieren. Diese selektiven Modulatoren der Kernrezeptoren bieten möglicherweise die Chance, gezielte Therapien für bestimmte Tumorarten zu entwickeln (Gronemeyer, Gustafsson et al. 2004) (Kremoser, Albers et al. 2007) (Voltz and Gronemeyer 2008).



**Abbildung 5** Schematische Darstellung des Aufbaus nukleärer Rezeptoren  
(Val, Lefrancois-Martinez et al. 2003)

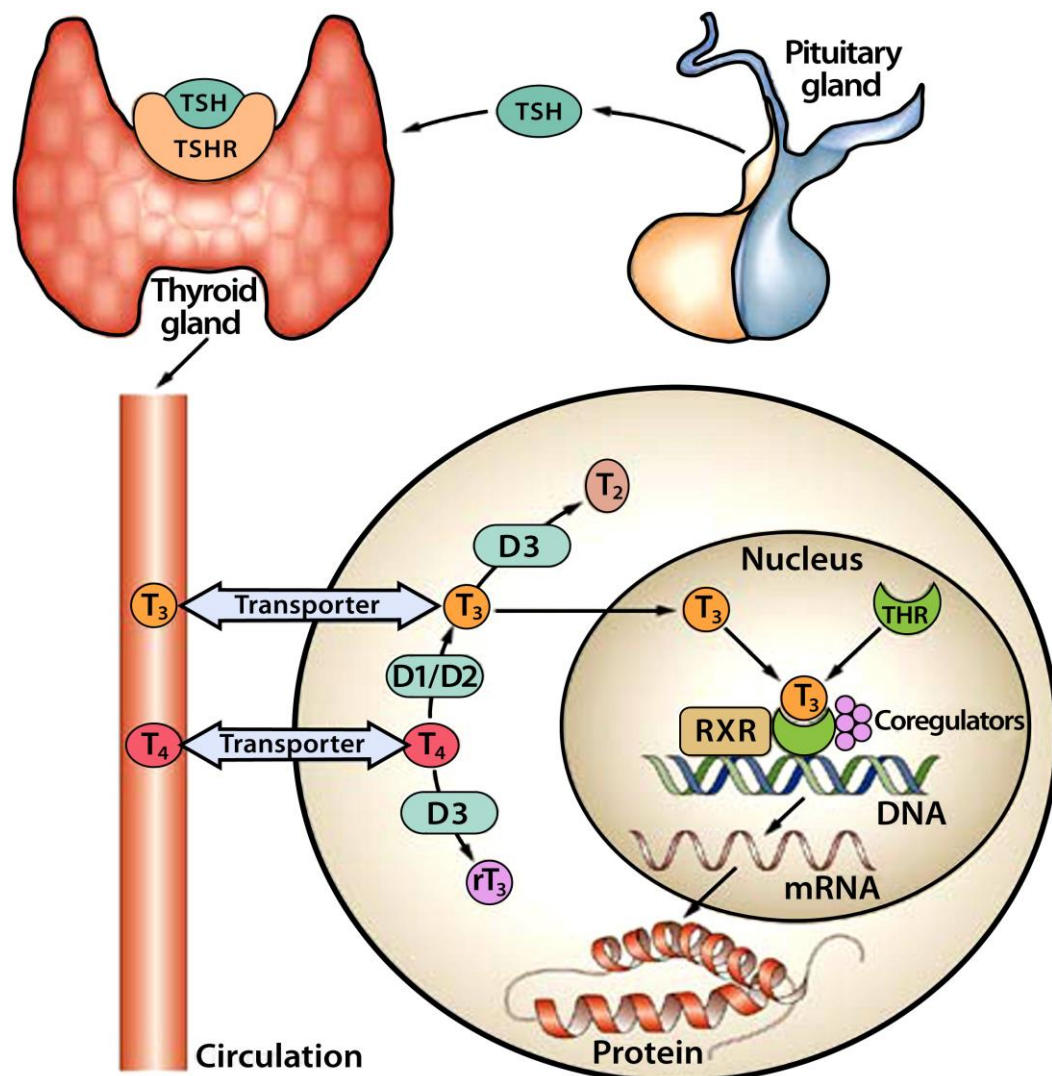
### 1.5.1 Die Schilddrüsenhormone und ihre Rezeptoren

Thyroidhormonrezeptoren (TR) gehören zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Die Synthese ihrer Liganden, der Schilddrüsenhormone, wird durch das hypothalamisch-hypophysäre System reguliert (Löffler, Petrides et al. 2007). Dabei produ-

ziert der Hypothalamus Thyrotropin releasing Hormone (TRH), welches im Hypophysenvorderlappen die Freisetzung des Thyroidea-stimulierenden Hormons (TSH) bewirkt. TSH induziert die Synthese und Sekretion der Thyroidhormone durch die Schilddrüse. Eine euthyreote Plasmakonzentration wird über negative Rückkopplungsmechanismen des hypothalamisch-hypophysären Systems sichergestellt. Thyroidhormone haben ein breites Wirkspektrum, sie sind wichtig für Wachstum, Differenzierung und Stoffwechsel. Ein Mangel an Schilddrüsenhormonen, ausgelöst durch unzureichende Jodzufuhr, führt zu Stoffwechselstörungen und Strumabildung. Bei Kindern führt die Unterversorgung mit Schilddrüsenhormonen zu Entwicklungsstörungen. Daneben gibt es Autoimmunerkrankungen, bei denen Stimulation bzw. Inhibierung des TSH-Rezeptors mittels Auto-Antikörpern Hyper- bzw. Hypothyreose auslöst. Mutationen der peripheren Thyroidhormonrezeptoren können Schilddrüsenhormonresistenz hervorrufen. Die Schilddrüse produziert Thyroidhormone in Form von 3,3',5-Triiod-L-thyronin ( $T_3$ ) und Thyroxin ( $T_4$ ). An Transportproteine gebunden können diese über das Blutplasma zu ihren Rezeptoren gelangen, wobei die physiologischen Plasmakonzentrationen für  $T_4$  bei ca. 110 nmol/l, für  $T_3$  bei ca. 2 nmol/l liegen (Löffler, Petrides et al. 2007). Die Thyroidhormonrezeptoren kommen in praktisch allen Gewebearten vor und werden im humanen Genom durch zwei verschiedene Gene kodiert (Rosen and Privalsky 2011). *THRA* befindet sich auf Chromosom 17 (Dayton, Selden et al. 1984), *THRB* auf Chromosom 3 (Albertson, Sherrington et al. 1989). Durch Verwendung unterschiedlicher Startstellen bei der Transkription und durch alternatives Spleißen können mehrere Isoformen des Thyroidhormonrezeptors gebildet werden (Löffler, Petrides et al. 2007). Sowohl von  $TR\alpha$  als auch von  $TR\beta$  sind drei Isoformen bekannt, wobei nur  $TR\alpha_1$  und die  $TR\beta$  Isoformen  $T_3$  binden können (Mitsunashi, Tennyson et al. 1988) (Williams 2000). Es herrscht Unklarheit darüber, ob die einzelnen Isoformen unterschiedliche Funktionen besitzen und die Zielgene der Thyroidhormonrezeptoren selektiv aktiviert werden. Die Ergebnisse aus Geninaktivierungsstudien legen nahe, dass TR Isoformen sowohl Subtyp-spezifische als auch sich überschneidende Funktionen haben und sich gegenseitig ersetzen können (Forrest, Hanebuth et al. 1996) (Fraichard, Chassande et al. 1997) (Gothe, Wang et al. 1999) (Cheng, Leonard et al. 2010). Ursprünglich ging man davon aus, dass Thyroidhormonrezeptoren Transkriptionsfaktoren sind, die ausschließlich nukleär lokalisiert sind. Mittlerweile wurde festgestellt, dass Thyroidhormonrezepto-

ren auch im Zytoplasma anzutreffen sind (Zhu, Hanover et al. 1998) und Schilddrüsenhormone Wirkungen außerhalb des Zellkerns auslösen können (Lynch, Andrews et al. 1985) (Bassett, Harvey et al. 2003). Im klassischen Modell der Thyroidhormonrezeptor Aktivierung (siehe Abb.6) gelangen die Thyroidhormone nach Aufnahme durch die Zielzelle in den Zellkern, wo sie Komplexe mit den Thyroidhormonrezeptoren bilden. Die Ligandenbindung bewirkt eine Konformationsänderung bei den Thyroidhormonrezeptoren, wodurch die Corepressoren dissoziieren und die Coaktivatoren rekrutiert werden (Martinez, Polikarpov et al. 2008). Thyroidhormonrezeptoren binden die DNA im Promotorbereich responsiver Gene an TREs (thyroid hormone response elements) und regulieren so die Transkription oder Repression ihrer Zielgene (Wu and Koenig 2000) (de Araujo, Martinez et al. 2010). Es vergehen mehrere Stunden, bis sich die Effekte der veränderten Transkriptionslage manifestieren (Davis, Leonard et al. 2008). Durch die Aktivierung der Thyroidhormonrezeptoren wird zum einen die Transkription weiterer Gene beeinflusst und zum anderen interagieren sie mit einer Vielzahl an zellulären Proteinen. Besonders zu nennen sind die Coaktivatoren (CoA) und -repressoren (CoR) der Thyroidhormonrezeptoren. Hauptcoaktivatoren sind die drei Steroidhormonrezeptor-CoAs (SRC-1, SRC-2, SRC-3), die in Komplexen mit anderen Coaktivatoren operieren. SRC-3 ist mit dem allgemeinen Transkriptionsfaktor CBP/ p300 assoziiert (Cheng, Leonard et al. 2010). Dazu kommt der große TRAP/DRIP Komplex, der sowohl mit den Thyroidhormonrezeptoren als auch mit dem Vitamin D Rezeptor interagiert (Fondell, Ge et al. 1996) (Rachez, Suldán et al. 1998) (Leo and Chen 2000). Corepressoren unterdrücken bei TR/RXR im ungebundenen Zustand die basale Transkription. Die wichtigsten Vertreter der Corepressoren sind NCoR (nuklear receptor CoR) und SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor) (Yen, Ando et al. 2006). Das Schilddrüsenhormon  $T_3$  hat eine höhere Affinität zu den Thyroidhormonrezeptoren als  $T_4$ , weswegen  $T_4$  auf genetischer Ebene als Prohormon gilt, welches mittels Deiodinase in  $T_3$  umgewandelt wird (Davis, Leonard et al. 2008). Thyroidhormonrezeptoren binden die DNA meist als Heterodimere mit RXR, wodurch die Bindung an TRE und die Ansprechbarkeit auf  $T_3$  verstärkt wird. Zudem wird die Transkriptionsrate erhöht. Auch die Heterodimerbildung mit anderen nukleären Rezeptoren ist möglich, beispielsweise mit dem Vitamin D Rezeptor oder anderen Retinsäure-Rezeptoren (Zhang and Pfahl 1993). Die transkriptionelle Aktivität der Thyroidhormonrezeptoren ist somit von einer

Vielzahl von Faktoren abhängig, insbesondere von der Art des TRE, vom Heterodimerisierungspartner, vom Rezeptor-Subtyp, von den Coregulatoren und von der verfügbaren Menge an Thyroidhormonen. Schilddrüsenhormone wirken nicht nur an den Thyroidhormonrezeptoren im Zellkern, sondern zeigen auch Wirkung an Membranrezeptoren, im Zytoplasma und in den Mitochondrien (Cheng, Leonard et al. 2010). Einer der Membranrezeptoren mit Bindungsstellen für Thyroidhormone ist Integrin  $\alpha\beta_3$ . Mithilfe von MAPK (Mitogen-activated protein kinase) kann das Hormonsignal weitergeleitet und dadurch Angiogenese, Endothel- und Tumorzellproliferation ausgelöst werden (Bergh, Lin et al. 2005) (Davis, Tang et al. 2006).



**Abbildung 6** Thyroidhormon vermittelte Transkription durch die Thyroidhormonrezeptoren (Dayan and Panicker 2009)

### 1.5.2 Rolle der Thyroidhormone und -rezeptoren bei der Karzinomentstehung

Historisch gesehen wurde das onkogene Potential des Thyroidhormonrezeptors  $\alpha$  vor seiner endokrinen Funktion erkannt (Rosen and Privalsky 2011). So wurde 1935 der AEV (Avian erythroblastosis retrovirus) als Retrovirus identifiziert, der Erythroleukämien und Fibrosarkome bei Hühnern auslöst (Engelbreth-Holm and Rothe Meyer 1935). Später fand man heraus, dass für die krebserzeugenden Eigenschaften des AEV die viralen Onkogene *v-erbA* und *v-erbB* verantwortlich sind (Vennstrom and Bishop 1982) (Graf and Beug 1983). Durch die veränderte Expression der für Zellproliferation und -differenzierung verantwortlichen Gene des Wirtes lösen *v-erbA* und *v-erbB* Neoplasien aus (Rosen and Privalsky 2011). Eine Verbindung zwischen *v-erbA* und *THRA* konnte erst 1986 hergestellt werden, als *v-erbA* als mutierter aviärer *THRA* identifiziert wurde (Sap, Munoz et al. 1986). Der *v-erbA* kann im Gegensatz zum Wildtyp *THRA* kein  $T_3$  mehr binden und agiert als Repressor der  $T_3$  regulierten Gene (Gonzalez-Sancho, Garcia et al. 2003).

Dieses Beispiel onkogener Wirkung eines mutierten *THRA* bei Hühnern weckt den Verdacht, Mutationen des *THRA* könnten auch bei der Entstehung humaner Neoplasien eine Rolle spielen. Veränderte Genexpression und Mutationen der Thyroidhormonrezeptoren konnten bei einigen Tumorarten festgestellt werden, darunter das hepatozelluläre Karzinom (Lin, Shieh et al. 1999), das Schilddrüsenkarzinom (Puzianowska-Kuznicka, Krystyniak et al. 2002), das Hypophysenkarzinom (McCabe, Gittoes et al. 1999) und das renale Klarzellkarzinom (Kamiya, Puzianowska-Kuznicka et al. 2002) (Gonzalez-Sancho, Garcia et al. 2003). Auch beim Mammakarzinom wurden Abweichungen der Genexpression von *THRA* und *THRB* gefunden (Silva, Dominguez et al. 2002).

Thyroidhormone fördern Zellwachstum und -differenzierung (Löffler, Petrides et al. 2007). Neben den Thyroidhormonrezeptoren beeinflussen sie noch weitere nukleäre Rezeptoren. Beispiel hierfür ist die Phosphorylierung einiger nukleärer Rezeptoren durch Thyroidhormone (Tang, Lin et al. 2004) (Davis, Leonard et al. 2008). Ob Thyroidhormone die maligne Transformation von Zellen fördern oder ob sie davor schützen, ist unklar. Epidemiologische Studien liefern Hinweise, dass Dysregulation des Thyroidhormonstoffwechsels ein erhöhtes Risiko für das Mamma- und Ovarialkarzinom darstellen. Diese Studien kommen jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen, einige zeigen ein erhöhtes Brustkrebsrisiko bei Hyperthyreose

(Saraiva, Figueiredo et al. 2005) (Tosovic, Bondeson et al. 2010), manche bei Hypothyreose (Kuijpers, Nyklicek et al. 2005) und bei einigen ist kein Zusammenhang ersichtlich (Weiss, Brinton et al. 1999) (Simon, Tang et al. 2002).

Die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms scheint durch Hyperthyreose begünstigt zu werden (Ness, Grisso et al. 2000). Zur weiteren Evaluierung des Mamma- und Ovarialkarzinomrisikos durch Thyroidhormone wurden Stimulierungsversuche an Zelllinien durchgeführt, wobei auch dort die Ergebnisse variierten. Es wurde sowohl von einer Proliferation senkenden Wirkung der Thyroidhormone bei Mammakarzinom-Zelllinien berichtet (Martinez, Ruan et al. 2000) (Cestari, Figueiredo et al. 2009) (Sar, Peter et al. 2011) als auch von einer Proliferation steigenden Wirkung (Tang, Lin et al. 2004) (Hall, Salazar et al. 2008).

Stimulierungsversuche an Ovarialepithelzellen ergaben, dass  $T_3$  die maligne Transformation dieser Zellen begünstigt (Rae, Gubbay et al. 2007).

Ein Zusammenhang zwischen *BRCA1* und *THRA* wurde erstmals vermutet, als Allelverluste in der Region von *THRA* bei sporadischen Mammakarzinomen gefunden wurden. Somit galt *THRA* als Kandidat für ein Tumorsuppressorgen bei Mamma- und Ovarialkarzinomen (Futreal, Soderkvist et al. 1992) (Gonzalez-Sancho, Garcia et al. 2003). Da Futreal et al. bei der Analyse weiterer Mammakarzinomproben und einiger Mammakarzinom-Zelllinien keine weiteren Punktmutationen im Bereich von *THRA* fanden, verwurfen sie die Tumorsuppressorgen-Hypothese (Futreal, Cochran et al. 1994). Neuere Forschungsergebnisse zeigen andere Möglichkeiten eines Zusammenhangs zwischen *BRCA1* und den nukleären Rezeptoren auf, beispielsweise über die Regulierung der *BRCA1* Expression durch einen gemeinsamen Coaktivator (Corkery, Thillainadesan et al. 2011).

In dieser Arbeit wurde anhand von Mamma- und Ovarialkarzinom-Zelllinien in vitro untersucht, welche Auswirkungen Thyroidhormone auf diese haben und was umgekehrt eine Inhibition von  $TR\alpha$  und  $\beta$  für deren Zellproliferation bedeutet. Um herauszufinden, ob *BRCA1* Mutationen dabei eine spezielle Rolle spielen, wurden *BRCA1* mutierte und aus sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen stammende Zelllinien miteinander verglichen.



### **1.5.3 Einsatz von Thyroidhormonrezeptor-Antagonisten**

Bisherige Experimente zur Inhibition der Thyroidhormonwirkung bei Mammakarzinomzellen verwenden zumeist Analoga der Thyroidhormone, beispielweise Tetrac (Rebbaa, Chu et al. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein anderer Ansatz gewählt, es sollte eine Inhibition auf Rezeptorebene stattfinden. Nebenwirkungen, die durch eine Veränderung des Plasmaspiegels zirkulierender Thyroidhormone entstehen, könnten so vermieden werden. Es wurden sogenannte STORMs (selektive Thyroidhormonrezeptor Modulatoren) eingesetzt (Flamant, Gauthier et al. 2007), die speziell gegen die Thyroidhormonrezeptoren gerichtet sind. Wirkgrundlage dieser Substanzen ist die Verhinderung der Thyroidhormon vermittelten Transkription durch Inhibierung der Coaktivatorbindung an die Thyroidhormonrezeptoren (Arnold, Estebanez-Perpina et al. 2005) (Schapira, Raaka et al. 2003). Zum einen wurde der Thyroidhormonrezeptor-Antagonist 1-850 eingesetzt, ein Hydrazinyl-Carboxamid, welches die Interaktion zwischen den Thyroidhormonrezeptoren und dem NRC (nuclear receptor coactivator) verhindert (Schapira, Raaka et al. 2003). Zum anderen kam das ungesättigte Keton H6039 zum Einsatz, welches die Bindung von SRC-2 an TR $\beta$  verhindert (Arnold, Estebanez-Perpina et al. 2005).

## 2 Fragestellung

Diese Doktorarbeit widmet sich der Frage, ob Thyroidhormone und -rezeptoren die Proliferation von Mamma- und Ovarialkarzinomzellen beeinflussen.

Im Zellkulturmodell soll herausgearbeitet werden, ob dieser Einfluss bei sporadischen und *BRCA1* mutierten Tumorzellen unterschiedlich ausfällt.

Darüber hinaus soll untersucht werden, ob die Zellproliferation der Tumorzellen durch den Einsatz selektiver Thyroidhormonrezeptor-Antagonisten inhibiert werden kann und ob dabei ein Unterschied zwischen *BRCA1* mutierten und nicht *BRCA1* mutierten Karzinomzellen feststellbar ist.

### 3 Material und Methoden

Sämtliche Experimente wurden in vitro an Mamma- und Ovarialkarzinom-Zelllinien durchgeführt. Um einen Überblick über die Thyroidhormonrezeptor-Proteinexpression bei den einzelnen Zelllinien zu erhalten, wurden immunzytochemische Färbungen angefertigt. Ergänzend hierzu wurde die mRNA Expression der Thyroidhormonrezeptoren, des Retinoid-X-Rezeptors und des Vitamin D Rezeptors mithilfe der QRT-PCR untersucht. Das Proliferationsverhalten der Zelllinien nach Stimulation mit Thyroidhormonen und Thyroidhormonrezeptor-Antagonisten wurde mittels BrdU-ELISA analysiert. Eine detaillierte Materialliste befindet sich im Anhang.

#### 3.1 Zelllinien

Für die Experimente wurden die Mammakarzinom-Zelllinien HCC3153 und MCF7, sowie die Ovarialkarzinom-Zelllinien UWB1.289 und OVCAR-3 verwendet. Charakteristisch für die Mammakarzinom-Zelllinie HCC3153 und die Ovarialkarzinom-Zelllinie UWB1.289 ist eine Mutation in der *BRCA1* Region. HCC3153, UWB1.289 und OVCAR-3 wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Bezugsquelle von MCF7 war die European Collection of Cell Cultures (ECACC).

#### 3.2 Zellkultur

Die Dauerkonservierung der Zelllinien erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -200°C. Dazu wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, mit Einfriermedium versetzt und in Kryoröhrchen überführt. Die Proben wurden über Nacht bei -80°C im Gefrierschrank in einer Einfrierbox mit Isopropanol langsam eingefroren und am nächsten Tag in einen Stickstofftank überführt. Um die Zelllinien in Kultur zu nehmen, wurde pro Zelllinie ein Kryoröhrchen im Wasserbad (37°C) aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in jeweils 10 ml DMEN in Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Zellen. Der dabei entstandene Überstand wurde abgezogen. Die Zellpellets wurden in je 12 ml Nährmedium gelöst und in T75 Flaschen ausgesät. Als Nährmedium diente DMEM mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% antibiotisch-antimykotischer Lösung. Die

Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C bei 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung inkubiert. Einmal pro Woche wurde das Nährmedium gewechselt. Zudem fand zur konstanten Aufrechterhaltung eines Zell-Monolayers eine wöchentliche Passagierung der Zellen statt. Dazu wurde das verbrauchte Nährmedium verworfen und der Zellrasen mit 8 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde der Zellrasen mit 2 ml Trypsin/EDTA für 10 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 8 ml Nährlösung inaktiviert.

Für die Zellzählung wurden 25 µl der Zellsuspension abgezogen und mit 25 µl Trypanblau und 50 µl PBS gemischt. Das Trypanblau diente der Markierung apoptotischer Zellen. Die Zellzählung erfolgte mithilfe der Neubauer Zählkammer, bei der je vier Quadranten ausgezählt wurden. Die Gesamtzahl der durchschnittlich vorhandenen Zellen errechnete sich aus der Summe der vier Quadranten  $\times 10 \times 10^4$ .

Der in den Flaschen verbliebene Anteil der Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei 1000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 5 Minuten zentrifugiert. Um eine definierte Zellzahl pro ml zu erhalten, wurde das über den Zellen verbliebene Medium verworfen und die im Zentrifugenröhrchen verbliebenen Zellen auf  $10^{-6}$  Zellen pro ml Nährmedium verdünnt. Die gewünschte Zellzahl wurde in die T75 Flaschen zurückgegeben und es wurde auf je 12 ml Flüssigkeit mit Nährmedium aufgefüllt.

### 3.3 Immunzytochemie

Ziel der hier durchgeführten immunzytochemischen Färbungen war es, die Proteinexpression von TRα und β bei den unterschiedlichen Mamma- und Ovarialkarzinom-Zelllinien darzustellen.

In der Immunzytochemie werden mithilfe von Antikörpern korrespondierende Antigene in den Zellen markiert. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe werden durch Antikörper gekoppelte Enzyme sichtbar gemacht.

Innerhalb dieser Arbeit wurde ein Verfahren eingesetzt, bei dem der spezifische Primärantikörper durch einen Sekundärantikörper und mithilfe eines ABC-Komplexes erkannt wird. Der Sekundärantikörper ist gegen die Spezies gerichtet, in der der Primärantikörper generiert wurde.

Da kernständige Antigene detektiert werden sollten, wurde zusätzlich eine Digitonin-Vorbehandlung zur Membranperforation durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Vorbehandlung mit Blockierungsserum. Dieses diente der Absättigung elektrostatischer Ladungen und somit der Blockierung unspezifischer Anfärbung, sowie der Reduktion unspezifischer Protein-Protein Interaktionen.

Die Immunzytochemie wurde mithilfe der Avidin-Biotin-Komplex Methode (ABC) durchgeführt. Diese Methode nutzt die Affinität von Avidin zu Biotin (Noll and Schaub-Kuhnen 2000). Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein mit vier möglichen Bindungsstellen zu Biotin. Mittlerweile wird statt Avidin Streptavidin eingesetzt, da teilweise unspezifische Reaktionen bei der Avidin-Verwendung auftreten. Die Verbindung zwischen Primärantikörper und AB-Komplex stellt ein Biotin markierter Brückenantikörper her. Das Enzym Peroxidase ist an die vom Brückenantikörper gebundenen AB-Komplexe gekoppelt. Bei Zugabe von Chromogenlösung wird eine enzymatische Reaktion mit der Peroxidase ausgelöst, bei der am Ort der Primärantikörperbindung ein lichtmikroskopisch sichtbarer Farbniederschlag entsteht.

Hier wurde als Chromogen der 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC-) Farbstoff verwendet. Als Gegenfärbung diente saures Hämalaun nach Mayer. Das Bläuen erfolgte mit Leitungswasser im alkalischen Milieu. Am stärksten werden bei dieser Methode die Kerne gefärbt, das Zellplasma bleibt zartblau. Auf das getestete Antigen positive Zellen zeigen ein rot-bräunliches Farbprodukt. Nach der Färbung wurden die Objektträger mit Aquatex auf wässriger Basis eingedeckt.

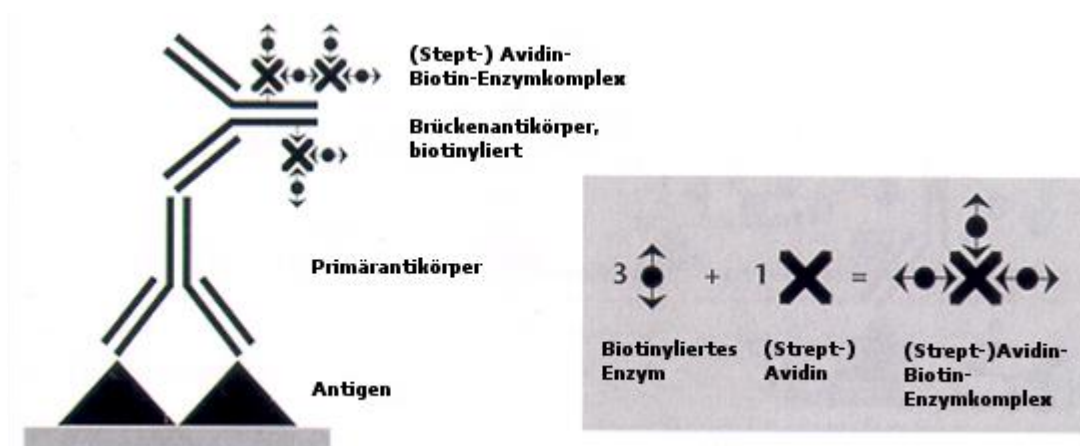


Abbildung 7 Funktionsprinzip der ABC-Methode (Noll and Schaub-Kuhnen 2000)

### 3.3.1 Herstellung der Objektträger für die Immunzytochemie

Zur Herstellung von Objektträgern wurden für jede Zelllinie quadriPERM® Zellkulturgefäße angelegt. Es wurden jeweils 300.000 Zellen pro Objektträger im Nährmedium für maximal neun Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Zur Fixierung wurden die Objektträger in PBS gewaschen und zunächst für fünf, dann noch einmal für 10 Minuten mit Ethanol/Methanol fixiert. Anschließend wurden die Objektträger getrocknet.

### 3.3.2 Durchführung der immunzytochemischen Färbungen

Die Färbungen wurden bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer durchgeführt. Als Primärantikörper dienten der Anti-Thyroid Hormone Receptor  $\alpha_{1+2}$  der Firma Abcam und der Anti-Thyroid Hormone Receptor  $\beta$  der Firma Zytomed Systems in einer Verdünnung von 1:30 in PBS. Für die ABC-Technik kam der Rabbit-IgG-Vectastain Elite ABC-Kit zum Einsatz. Die Färbungen wurden nach unten genanntem Schema angefertigt.

### 3.3.3 Schema Immunzytochemie

5 min	Waschen der Objektträger in PBS
15 min	Vorbehandlung mit Digitonin
5 min	Waschen der Objektträger in PBS
20 min	Inkubation mit Blockierungsserum, anschließend Abkippen des Serums
17 h	Inkubation mit Primärantikörper bei 4°C
2 x 2 min	Waschen der Objektträger in PBS
30 min	Inkubation mit Sekundärantikörper
2 x 2 min	Waschen der Objektträger in PBS
30 min	Inkubation mit ABC-Antikörper
2 x 2 min	Waschen der Objektträger in PBS
ca. 4 min	Färbung mit AEC-Farbstoff unter Mikroskop-Beobachtung, anschließend in Aqua dest.
30 sec	Kern-Gegenfärbung in Hämalaun

4 min	fließendes Wässern, Eindecken mit Aquatex, Trocknung
-------	------------------------------------------------------------

### 3.3.4 Auswertung der immunzytochemischen Färbungen

Die immunzytochemisch gefärbten Objektträger wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Leitz, Wetzlar) ausgewertet und anschließend digital fotografiert (JVC, Japan). Die Beurteilung der Objektträger erfolgte bei 25-facher Vergrößerung.

Die Auswertung der Objektträger erfolgte mit Hilfe des semiquantitativen immunreaktiven Scores (IRS) von Remmele und Stegner (Remmele and Stegner 1987), welcher sich als Produkt von Färbeintensität (Staining Intensity = SI) und Prozentsatz positiv gefärbter Zellen (PP) errechnet.

Die IRS-Werte wurden mit Hilfe des Mann-Whitney Tests ausgewertet, wobei von einem signifikanten Unterschied bei einem p-Wert  $p < 0,05$  ausgegangen wurde.

Zur Datenerfassung diente das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel, die statistische Analyse und die Erstellung der Boxplot-Diagramme wurde mit SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Version 17 durchgeführt.

$$\text{IRS} = \text{SI} \times \text{PP}$$

Einteilung der Färbeintensität (SI)
0 = keine Expression
1 = schwache Färbereaktion
2 = mäßige Färbereaktion
3 = starke Färbereaktion

Bewertung des Prozentsatzes positiver Zellen (PP)
0 = keine positiven Zellen
1 = weniger als 10 % positive Zellen
2 = 10-50 % positive Zellen

3 = 51-80 % positive Zellen
-----------------------------

4 = mehr als 80 % positive Zellen
-----------------------------------

Durch die Multiplikation beider Parameter ergeben sich für den IRS-Score Werte zwischen null und zwölf.

Bei der Auswertung der Ergebnisse werden die Proteinexpressionsgrade folgendermaßen beurteilt:

0-1 = Rezeptor-negativ
------------------------

2-3 = Rezeptor-positiv, schwache Expression
---------------------------------------------

4-8 = Rezeptor-positiv, mäßig starke Expression
-------------------------------------------------

9-12 = Rezeptor-positiv, starke Expression
--------------------------------------------

### 3.4 Quantitative RT-PCR

Um einen Überblick über die Genexpression verschiedener nukleärer Rezeptoren bei den betrachteten Zelllinien zu erhalten, wurden sie mittels quantitativer Real-Time Polymerasekettenreaktion (QRT-PCR) untersucht. Voraussetzung hierfür war die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellen mit anschließender Transkription der mRNA in die dazu komplementäre cDNA. Die reverse Transkription der mRNA ist nötig, da eine PCR nur mit c-DNA durchgeführt werden kann.

Mit der quantitativen Real-Time PCR kann nach dem PCR-Prinzip DNA amplifiziert und zusätzlich das Ausgangsprodukt quantifiziert werden. Grundlage hierfür ist, dass ein fluoreszierender Farbstoff in die DNA mit eingebaut wird (Mühlhardt 2009). Hier kam ein System mit TaqMan<sup>®</sup>-Sonden (Applied Biosystems) zum Einsatz, welches ermöglicht, während der PCR selektiv das gewünschte DNA-Produkt nachzuweisen. TaqMan<sup>®</sup>-Sonden sind kurze DNA-Stücke, die mit einem mittleren Bereich der Template-DNA hybridisieren (Roche 2003). Am 5' Ende der TaqMan<sup>®</sup>-Sonde befindet sich ein Reporterfarbstoff (R) und am 3' Ende ein Quencher (Q).



Solange sich der Reporterfarbstoff in der Nähe des Quenchers befindet, fängt der Quencher die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes ab. Eine Besonderheit der Taq-Polymerasen im PCR Ansatz ist, dass sie 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzen. Sobald die Polymerase die TaqMan<sup>®</sup>-Sonde bei der Verlängerung des Primers erreicht, wird die TaqMan<sup>®</sup>-Sonde am 5'-Ende abgebaut. Dadurch wird der Reporterfarbstoff vom Quencher getrennt. Da sich der Reporterfarbstoff nun außerhalb des Einflussbereichs des Quenchers befindet, kann er Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Somit ist die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes nur dann messbar, wenn die Polymerase den gewünschten DNA-Strang tatsächlich kopiert hat. Da jedes freigesetzte Molekül an Reporterfarbstoff für einen gebildeten DNA-Strang steht, kann durch TaqMan<sup>®</sup>-Sonden jederzeit die Menge gebildeter DNA gemessen werden (Roche 2003).

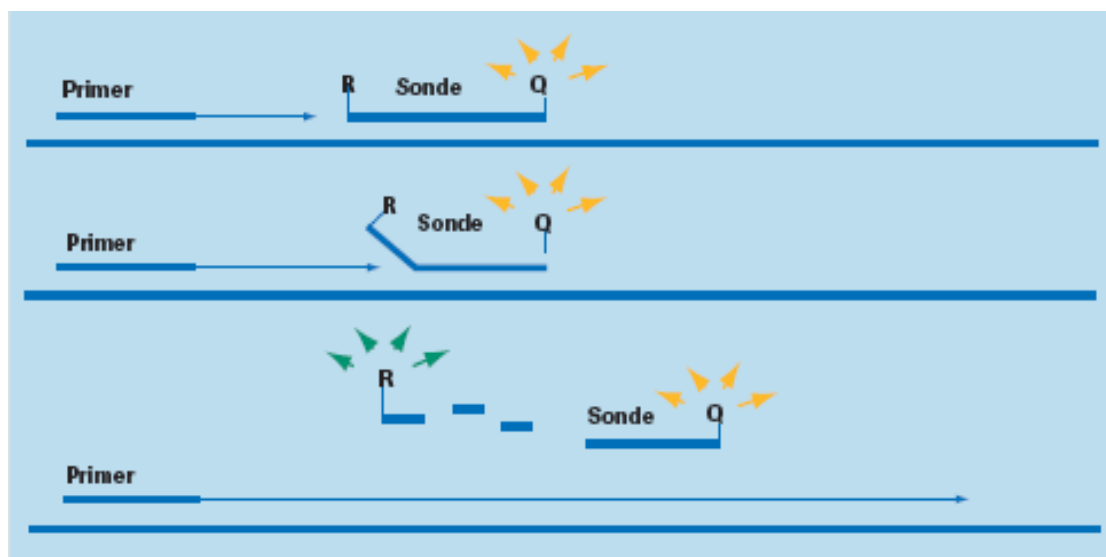


Abbildung 8 Funktionsprinzip der TaqMan<sup>®</sup>-Sonden bei der QRT-PCR (Roche 2003)

Grundsätzlich gibt es bei der QRT-PCR die Möglichkeit der relativen und der absoluten Quantifizierung. Hier wurde eine relative Quantifizierung vorgenommen, bei der die mRNA-Menge des zu messenden Gens relativ zum Kontrollgen (Referenzgen bzw. Haushaltsgen) bestimmt wird. Haushaltsgene sollten in jeder Probe konstant exprimiert werden.

### 3.4.1 Isolation der Gesamt-RNA

Für diesen Arbeitsschritt wurde der NucleoSpin® RNAII Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Pro Zelllinie wurden  $1 \times 10^6$  Zellen, die jeweils in 1 ml Nährmedium gelöst waren, eingesetzt. Die Zellzahl wurde zuvor mithilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Es wurde auf RNase freie Arbeitsbedingungen geachtet. Die Arbeitsschritte erfolgten gemäß Isolierungsprotokoll.

Als erstes erfolgte die Homogenisierung der Probe. Dazu wurden die Zellen in Microtubes überführt und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen. Beim nächsten Schritt erfolgte die Zellyse, indem je 350 µl Lysepuffer (RA1) und 3,5 µl  $\beta$ -Mercaptoethanol auf das Zellpellet pipettiert wurde. Um das Lysat weiter vorzubereiten, wurde es auf einen NucleoSpin Filter pipettiert und 1 min bei 11000 g zentrifugiert. Anschließend wurden die RNA-Bindungsbedingungen angepasst, indem je 350 µl Ethanol (70 %) zugegeben und mit dem Lysat vermischt wurden. Dann wurde das Lysat auf eine NucleoSpin RNA II Säule pipettiert und 30 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend in ein neues Sammelgefäß gesteckt. Um die Silica Membran zu entsalzen, wurde 350 µl Membrane Desalting Buffer auf die Säule pipettiert und die Membran zur Trocknung eine Minute bei 11000 g zentrifugiert. Für den DNA-Verdau wurde ein DNase Mix aus je 10 µl rekonstruierter rDNase und 90 µl Reaction Buffer hergestellt. Je 95 µl davon wurden auf die Silica Membran der Säule gegeben und anschließend bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Darauf erfolgten drei Wasch-Schritte, bei denen die Silica Membran gewaschen und getrocknet wurde. Zunächst wurden 200 µl RA2 Puffer auf die NucleoSpin RNA II Säule gegeben und 30 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Sammelgefäß gesteckt, dann wurden 600 µl RA3 Puffer zugegeben und wiederum 30 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und die Säule zurück ins Sammelgefäß gesteckt. Anschließend wurde 250 µl RA3 Puffer auf die Säule pipettiert und die Probe zwei Minuten bei 11000 g zentrifugiert, um die Membran komplett zu trocknen. Zur Isolierung der RNA wurde die Säule in ein nukleasefreies Mikrozentrifugenröhrchen gesteckt und es wurde je 60 µl RNase freies Wasser auf die Säule pipettiert. Durch das Zentrifugieren der Zentrifugenröhrchen für 1 Minute bei 11000 g wurde die RNA eluiert. Die gewonnene RNA wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank aufbewahrt.

### 3.4.2 Schema RNA-Isolation

1.	Zentrifugation der Zellen bei 1000 rpm für 5 min
2.	Zugabe von 350 µl Lysis-Puffer (RA1) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol
3.	Einbringen des Nucleo Spin Filters in das Sammelgefäß, Pipettieren des Zelllysats auf den Nucleo Spin Filter, Zentrifugation bei 11000 g für 30 sec
4.	Entfernung des Nucleo Spin Filters, Zugabe von 350 µl Ethanol (70 %)
5.	Mischen des Lysats mit der Pipette (3 x), Pipettieren des Zelllysats auf eine NucleoSpin RNA II Säule, Zentrifugation bei 11000 g für 30 sec, Einbringen der Säule in neues Sammelgefäß
6.	Zugabe von 350 µl Membran Desalting Buffer Zentrifugation bei 11000 g für 1 min
7.	Herstellung eines DNase Mix (je Isolation 10 µl rekonstruierte rDNase + 90 µl Reaction Buffer for rDNase), Pipettieren von je 95 µl DNase Mix auf die Silica-Membran, Inkubation bei RT für 15 min
8.	Zugabe von 200 µl RA2 Puffer, Zentrifugation für 30 sec bei 11000 g, Einsetzen der Säule in neues Sammelgefäß; Zugabe von 600 µl RA3 Puffer, Zentrifugation für 30 sec bei 11000 g, Verwerfen des Zentrifugats, Einsetzen der Säule ins Sammelgefäß; Zugabe von 250 µl RA3 Puffer, Zentrifugation für 2 min bei 11000 g, Einsetzen der Säule in ein Mikrozentrifugenröhrchen
9.	Pipettieren von 60 µl RNase freiem Wasser auf die Säule
10.	Lagerung der RNA bei -80°C

### 3.4.3 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Die reverse Transkription (RT) wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die Kitkomponenten wurden aufgetaut, gemischt und im Eisblock kühl gestellt. Der 2x RT Mastermix wurde nach dem in Abbildung 9 dargestellten Mischverhältnis hergestellt. Es wurden jeweils 10 µl mRNA zu 10 µl 2x RT-Mastermix in Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert und gemischt. Die Transkription der Proben in cDNA erfolgte im Eppendorf Mastercycler®gradient. Das zugehörige Temperaturprotokoll ist in Abbildung 10 dargestellt. Die umgeschriebene cDNA wurde bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Komponente:	Volumen in µl (für eine Probe):
10x RT Buffer	2,0
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8
Random Hexamer Primer	2,0
RNAse Inhibitor	1,0
Nuklease freies Wasser	3,2
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1,0
<b>= Insgesamt pro Reaktion</b>	<b>10µl</b>

Abbildung 9 Komponenten des 2x RT Mastermix

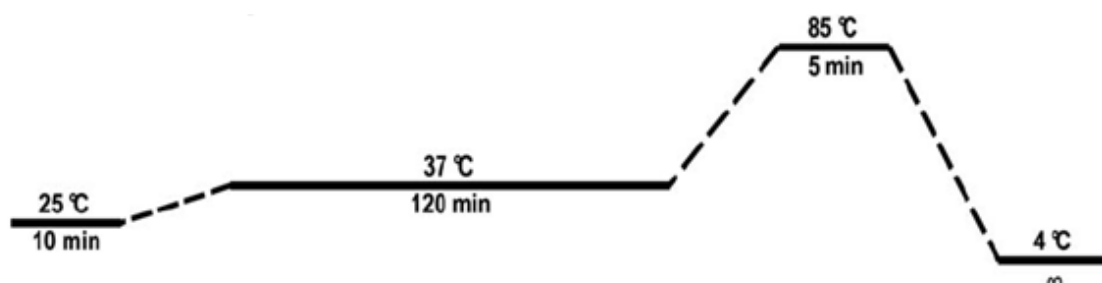


Abbildung 10 Temperaturprotokoll der reversen Transkription

### 3.4.4 Schema reverse Transkription

1.	Auftauen des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Kühlstellen der Komponenten im Eisblock
2.	Herstellung des 2x RT Mastermix gemäß Abb. 9
3.	Pipettieren von je 10 µl 2x RT- Mastermix in Mikrozentrifugenröhrchen
4.	Zugabe von je 10 µl RNA
5.	Einbringen der Proben in den Eppendorf Mastercycler <sup>®</sup> gradient
6.	Temperaturwahl entsprechend Abb. 10
7.	Lagerung der Proben bei -20°C

### 3.4.5 Durchführung der quantitativen RT-PCR

Mit Hilfe der QRT-PCR wurden die oben genannten Zelllinien auf die Genexpression von Retinoid X Rezeptor (*RXR*), Thyroidhormon-Rezeptor  $\alpha$  (*THRA*), Thyroidhormon-Rezeptor  $\beta$  (*THRB*) und Vitamin D Rezeptor (*VDR*) untersucht. Als endogene Kontrollgene wurden Beta Actin (*ACTB*) und Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (*GAPDH*) getestet. Die Wahl fiel auf *GAPDH* als Referenzgen, da *GAPDH* bei den betrachteten Zelllinien konstanter exprimiert wurde als *ACTB*. Genauere Angaben zu den Primern sind in der Materialliste enthalten.

Die zuvor durch Umschreibung gewonnene cDNA der Zellen und der TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay (Applied Biosystems) wurden aufgetaut und auf Eis gelagert. Der TaqMan<sup>®</sup> Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) wurde dem Kühlschrank entnommen und bereitgestellt. Der TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay besteht aus Vorwärts-, Rückwärtsprimer und der TaqMan<sup>®</sup> MGB Probe. Im TaqMan<sup>®</sup> Fast Universal PCR Master Mix sind eine Hot-Start DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP und ein spezielles Puffersystem enthalten. Für die QRT-PCR wurden Optical Fast 96-Well-Platten von Applied Biosystems verwendet. In jedes Well wurden jeweils 19 µl Mastermix und 1 µl cDNA bzw. 1 µl nukleasefreies Wasser für die Negativkontrollen pipettiert. Die genaue Zusammensetzung des Mastermixes kann Abb. 11 entnommen werden. Die Wasserprobe wurde als Negativkontrolle zum Ausschluss unspezifischer Amplifikation mitgeführt. Die 96-Well-Platte wurde mit einem Adhesive Cover (Applied Biosystems) verschlossen. Die QRT-PCR wurde mit dem 7500 Fast Real-Time PCR Gerät von Applied Biosys-

tems durchgeführt. Das QRT-PCR Temperaturprotokoll ist in Abbildung 12 dargestellt. Die Eingabe der Proben- und Primerdaten in das Gerät erfolgte durch die SDS Software Version 1.3.1.

<b>Komponente:</b>	<b>Volumen in µl (pro Probe):</b>
TaqMan® Gene Expression Assay; 20x Konz.	1,0
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix; 2x Konz.	10,0
nukleasefreies Wasser	8,0

**Abbildung 11** Komponenten des TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix

	<b>Enzyme Activation</b>	<b>Real Time PCR</b>	
	Hold	40 cycles	
<b>Temp</b>	95°C	Denature 95°C	Annealing/ Extend 60°C
<b>Time</b>	20 sec	3 sec	30 sec

**Abbildung 12** Temperaturprotokoll der quantitativen RT-PCR

### 3.4.6 Schema quantitative RT-PCR

1.	Mischen des Mastermixes gemäß Abb.11
2.	Pipettieren von je 19 µl Mastermix pro Well
3.	Zugabe von je 1 µl cDNA/ Nuklease freiem Wasser
4.	Einbringen der 96-Well-Platte in das Fast Real-Time PCR Gerät

### 3.4.7 Auswertung der quantitativen RT-PCR

Die relative Quantifizierung erfolgte mithilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Der Ct-Wert (engl. Cycle threshold für Schwellenwert-Zyklus) bezeichnet hierbei den Zyklus, in dem die Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Durch die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode können die Unterschiede der Genexpression zwischen zwei Proben ausgewertet werden. Hier wurde jeweils die *BRCA1* mutierte Zelllinie in Relation zur nicht *BRCA1* mutierten Zelllinie gesetzt. Als Referenzgen diente *GAPDH*. Die Unterschiede der x-fachen Genexpression wurden nach den in Abb.13 dargestellten Gleichungen berechnet.

Die Statistische Analyse wurde in Form von Mann-Whitney U Tests mithilfe des Statistikprogramms SPSS Version 17 durchgeführt.

$$\begin{aligned}\Delta\text{Ct} &= \text{Ct}_{(\text{Zielgen})} - \text{Ct}_{(\text{Referenzgen})} \\ \Delta\Delta\text{Ct} &= \Delta\text{Ct}_{(\text{Probe})} - \Delta\text{Ct}_{(\text{Kalibrator})} \\ \text{x-fache Expression des Zielgens} &= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}\end{aligned}$$

Abbildung 13 Gleichungen zur  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

Zielgene: *THRA / THRB / RXR / VDR*

Referenzgen: *GAPDH*

Probe: *BRCA1* mutierte Zelllinie

Kalibrator: *BRCA1* Wildtyp Zelllinie

## 3.5 BrdU-ELISA

Zur Untersuchung der Wirkung bestimmter Stimulanzien auf die Zellproliferation der Mamma- und Ovarialkarzinom-Zelllinien kam der Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) der Firma Roche zum Einsatz.

Funktionsprinzip dieses ELISAs ist, dass 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU), ein synthetisch hergestelltes Thymidin-Analogon, während der Zellreplikation anstelle des Thymidins in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird (Roche 2004).

Für dieses Experiment werden Zellen in 96-Well Platten kultiviert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit den auf Proliferationswirkung zu untersuchenden Substanzen. Daraufhin werden die Zellen durch die Zugabe der BrdU Substanz markiert. Nach Entfernung des mit BrdU versetzten Nährmediums werden die Zellen fixiert und die DNA wird schrittweise denaturiert. Anschließend wird ein gegen das BrdU gerichteter Antikörper eingesetzt, der an das inkorporierte BrdU bindet. Die entstandenen farbigen Reaktionsprodukte können über eine Absorptionsmessung im Spektralphotometer (ELISA-Reader) quantifiziert werden.

### 3.5.1 Durchführung des BrdU-ELISA

Für jede Zelllinie wurde eine 96-Well Platte mit je 50.000 Zellen in jeweils 50 µl Nährmedium angelegt. Die Inkubation der Platten erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Sättigung. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit den in Abb.14 dargestellten Substanzen stimuliert.

1.	3,3',5-Triiodo-L-Thyronin (T <sub>3</sub> )
2.	L-Thyroxine (T <sub>4</sub> )
3.	2-(2-(-(4-Nitrophenyl)-4-piperidinylidene)acetyl-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1-hydrazine Carboxamide (Thyroid Hormone Receptor Antagonist 1-850)
4.	1-(4-Hexylphenyl)-propen-1-one (Thyroid Hormone Receptor Antagonist H6039)

**Abbildung 14 Stimulanzen**

Die Stimulanzen wurden nach Herstellerempfehlung in DMSO gelöst und den Konzentrationen entsprechend mit Nährmedium verdünnt, so dass 50 µl Flüssigkeit pro Well pipettiert werden konnten. Es wurde mit Konzentrationen von 0,1 nmol/ml, 1,0 nmol/ml und 10 nmol/ml gearbeitet. Zur Bestimmung des Leerwertes wurden pro Platte drei Wells nur mit Nährlösung und nachfolgender BrdU-Behandlung versehen. Dieser Leerwert wurde im Anschluss von den anderen Messwerten abgezogen. Zusätzlich wurden pro Platte sechs Wells ausschließlich mit der entsprechenden Zelllinie in Nährlösung und BrdU-Behandlung versehen,



um Vergleichswerte zu den mit den Stimulanzen behandelten Zellen zu erzielen. Für jedes Stimulanz wurden pro Konzentration sechs Wells bestückt. Anschließend wurden die Platten für 48 Stunden mit den Stimulanzen inkubiert. Dann wurde die BrdU Labeling Reagenz (10 µl/Well) für 24 Stunden zugesetzt. Die Flüssigkeit wurde aus den 96-Well Platten abgeklopft, die Platten mit den verbliebenen Zellen bei 60°C für eine Stunde getrocknet und 3 Tage bei 4°C aufbewahrt. Gemäß der Gebrauchsanleitung wurden 200 µl Fix-Denat/Well zugegeben, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss wieder entfernt. Dann wurden die Platten 90 Minuten bei RT mit 100 µl Anti-BrdU POD/Well inkubiert. Nach Entfernung des Anti-BrdU PODs wurden die Wells je dreimal mit 200 µl Waschpuffer/Well gewaschen. Daraufhin wurde die Substratlösung mit 100 µl/Well zugegeben und 20 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 25 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Well gestoppt, die Platten für 1 Minute auf dem Plattenshaker gerüttelt. Die spektralphotometrische Messung erfolgte im ELISA-Reader bei 450 nm Wellenlänge und 690 nm Referenzwellenlänge.

### 3.5.2 Schema BrdU-ELISA

1.	Anlegen von 96-Wellplatten: Pipettieren von 50.000 Zellen in 50 µl Nährmedium pro Well, Inkubation für 24 h
2.	Zugabe der Stimulanzen bzw. Kontrollen, Inkubation für 48 h
3.	Pipettieren von 10 µl BrdU Labeling Reagenz pro Well Inkubation für 24 h
4.	Abklopfen der Flüssigkeit, Trocknung bei 60°C für 1 h
5.	Lagerung bei 4°C
6.	Pipettieren von 200 µl Fix-Denat pro Well, Inkubation für 30 min bei RT, Abklopfen des Fix-Denat
7.	Pipettieren von 100 µl Anti-BrdU POD pro Well, Inkubation für 90 min bei RT

	Abklopfen des Anti-BrdU POD
8.	Waschen 3 x mit 200 µl Waschpuffer pro Well, Abklopfen des Waschpuffers
9.	Zugabe von je 100 µl Substratlösung pro Well, Inkubation für 20 min im Dunkeln bei RT
10.	Stoppen der Reaktion mit 25 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pro Well Rütteln auf Plattenshaker für 1 min
11.	Einbringen der Platten in ELISA-Reader

### 3.5.3 Auswertung des BrdU-ELISAs

Für die Erstellung von Diagrammen und Tabellen wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Test mithilfe des Programms SPSS Version 17 für Windows.

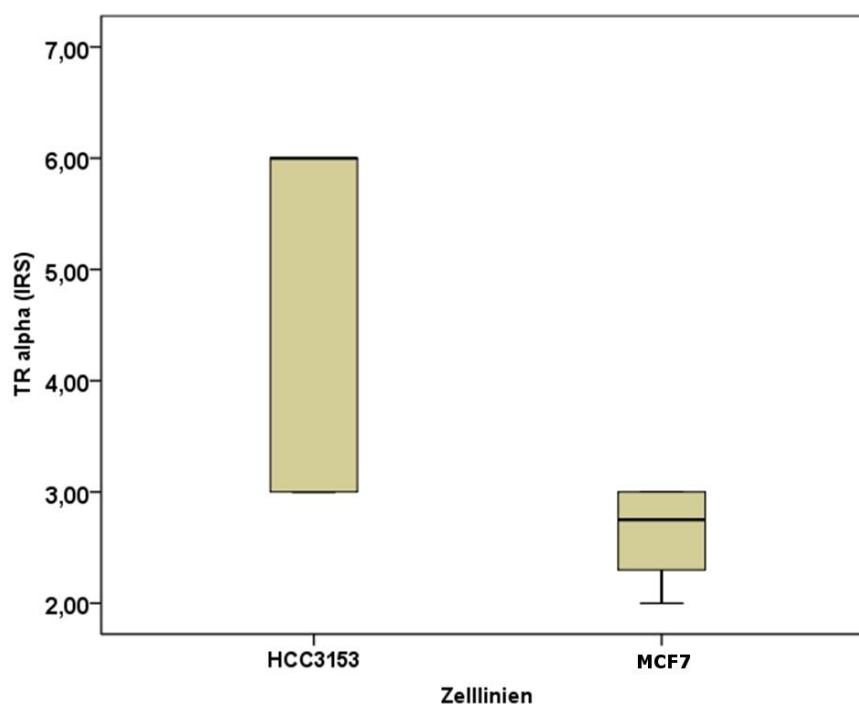
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der Immunzytochemie

Mithilfe der Immunzytochemie wurde die Proteinexpression der Thyroidhormonrezeptoren bei Zelllinien aus *BRCA1* mutierten und sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen analysiert. Es konnte eine schwache bis mäßig starke Proteinexpression von TR $\alpha$  und  $\beta$  nachgewiesen werden.

#### 4.1.1 Thyroidhormonrezeptor $\alpha$ Proteinexpression bei Mammakarzinom-Zelllinien

Die *BRCA1* mutierte Mammakarzinom-Zelllinie HCC3153 wies im Zellkern eine 1,9-fach höhere TR $\alpha$  Proteinexpression auf als die nicht *BRCA1* mutierte Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 (IRS =  $5 \pm 0,7$  vs. IRS =  $2,6 \pm 0,2$ ;  $p = 0,011$ ). Zusätzlich war TR $\alpha$  bei HCC3153 im Zytosol exprimiert.



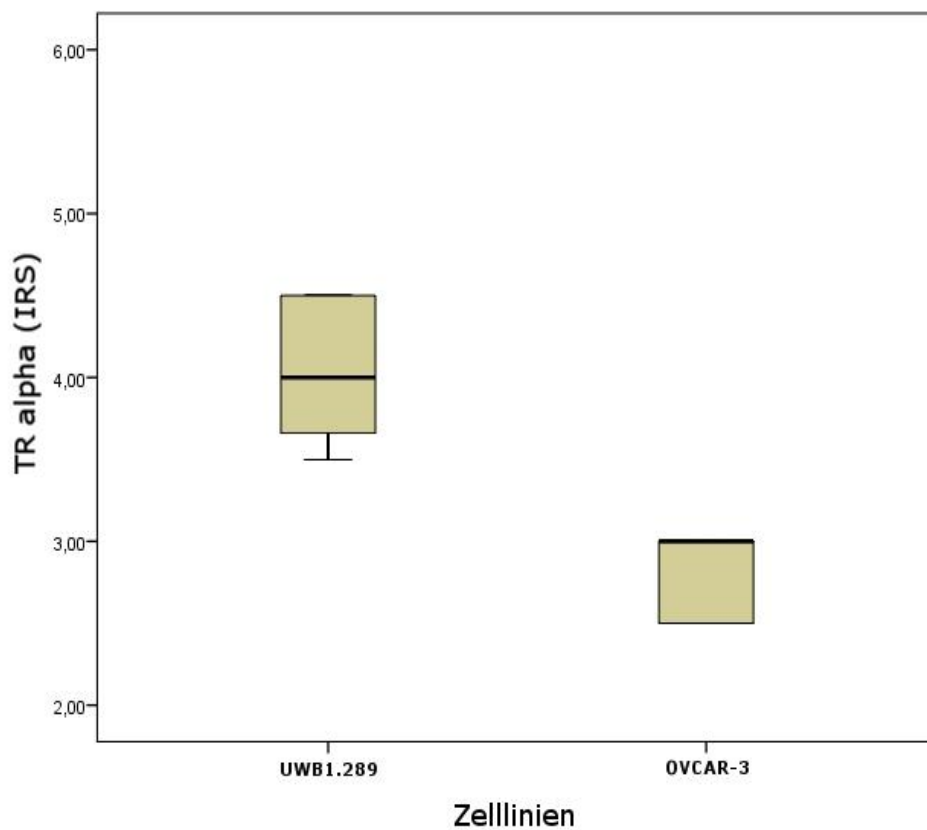
**Abbildung 15** Die Proteinexpression von TR $\alpha$  wurde bei HCC3153 (*BRCA1* mutiert) und MCF7 (*BRCA1* Wildtyp) immunzytochemisch bestimmt und mittels IRS quantifiziert.

**HCC3153 zeigte eine 1,9x stärkere Expression des TR $\alpha$  Proteins.**

Boxplot-Diagramm: die Box gibt den Bereich zwischen der 25. und 75. Perzentile an, der waagrechte Balken zeigt den Median. Der höchste Wert über der 75. Perzentile bzw. der kleinste Wert unter der 25. Perzentile werden durch Fehlerbalken dargestellt.

#### 4.1.2 Thyroidhormonrezeptor $\alpha$ Proteinexpression bei Ovarialkarzinom-Zelllinien

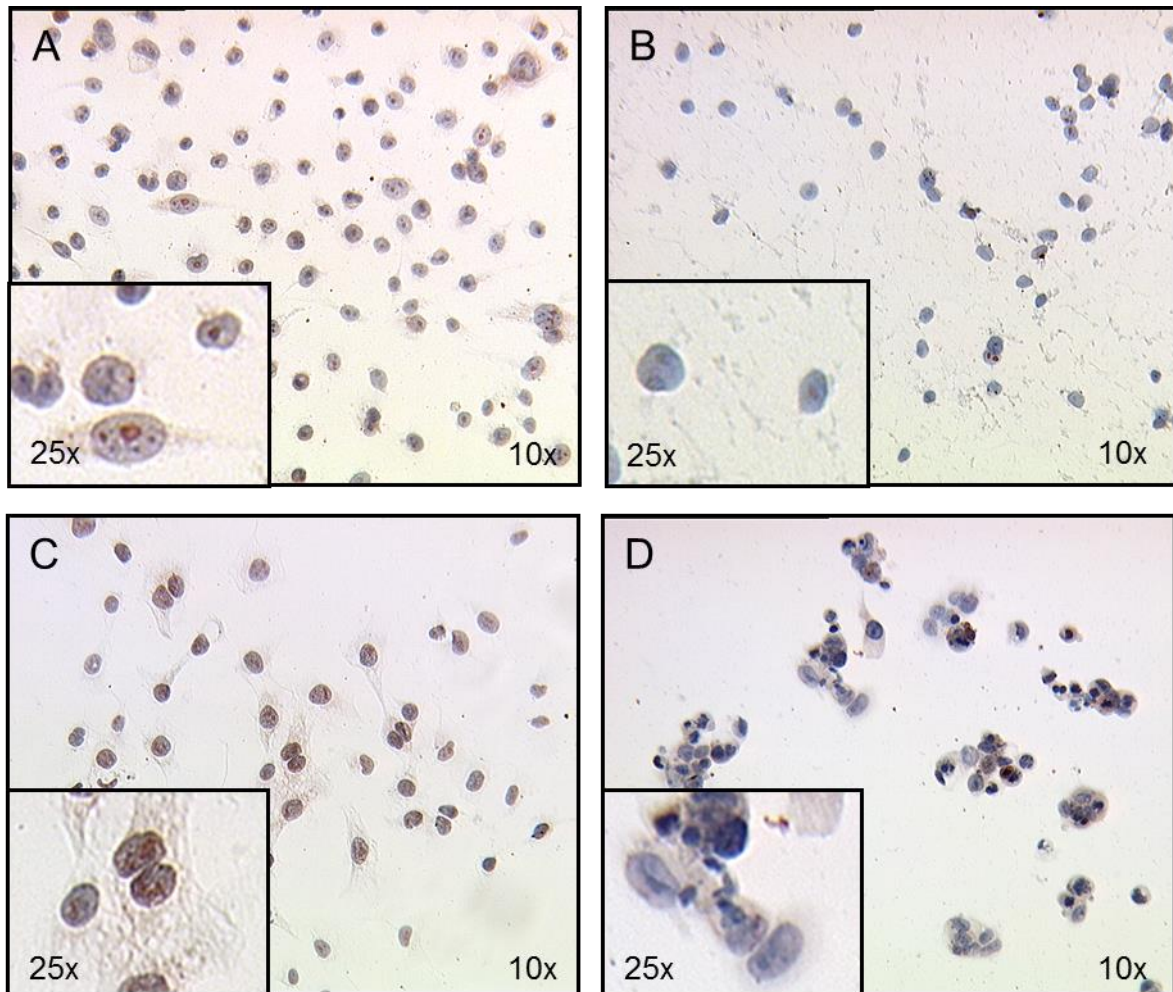
Die *BRCA1* mutierte Ovarialkarzinom-Zelllinie UWB1.289 zeigte eine 1,4 fach höhere TR $\alpha$  Proteinexpression im Zellkern als OVCAR-3 (IRS =  $4,3 \pm 0,4$  vs. IRS =  $3 \pm 0,2$ ;  $p = 0,015$ ). Bei beiden Zelllinien war TR $\alpha$  auch im Zytosol exprimiert.



**Abbildung 16** Die Proteinexpression von TR $\alpha$  wurde bei UWB1.289 (*BRCA1* mutiert) und OVCAR-3 (*BRCA1* Wildtyp) immunzytochemisch bestimmt und mittels IRS quantifiziert.

**UWB1.289 zeigte eine 1,4x stärkere Expression des TR $\alpha$  Proteins.**

Boxplot-Diagramm: die Box gibt den Bereich zwischen der 25. und 75. Perzentile an, der waagrechte Balken zeigt den Median. Der höchste Wert über der 75. Perzentile bzw. der kleinste Wert unter der 25. Perzentile werden durch Fehlerbalken dargestellt.



**Abbildung 17 A-D Immunzytochemischer Nachweis von TRα**

Die Proteinexpression von TRα wurde bei den Mammakarzinom-Zelllinien (A) HCC3153 (*BRCA1* mutiert) und (B) MCF7 (*BRCA1* Wildtyp) immunzytochemisch bestimmt und mittels IRS verglichen. Analog dazu wurde die TRα Proteinexpression der Ovarialkarzinom-Zelllinien (C) UWB1.289 (*BRCA1* mutiert) und (D) OVCAR-3 (*BRCA1* Wildtyp) verglichen.

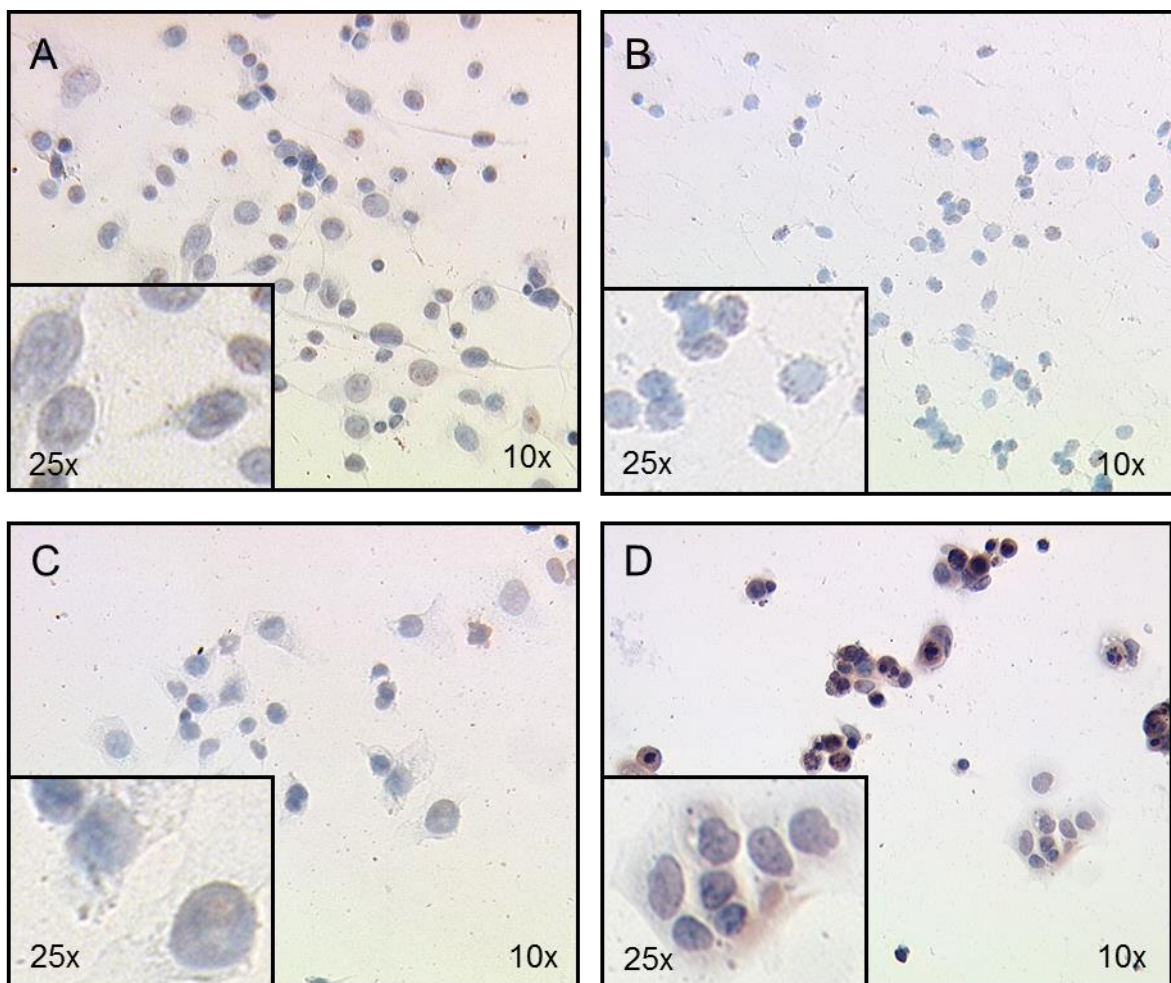
Vergrößerung 10x und 25x

#### **4.1.3 Thyroidhormonrezeptor β Proteinexpression bei Mammakarzinom-Zelllinien**

Die Proteinexpression von TRβ war bei der *BRCA1* mutierten Mammakarzinom-Zelllinie HCC3153 im Zellkern etwas schwächer als bei MCF7 (IRS =  $1,8 \pm 0,2$  vs. IRS =  $2,5 \pm 0,2$ ;  $p = 0,031$ ). Bei HCC3153 war TRβ auch im Zytosol exprimiert.

#### 4.1.4 Thyroidhormonrezeptor $\beta$ Proteinexpression bei Ovarialkarzinom-Zelllinien

TR $\beta$  war in den Zellkernen von UWB1.289 und OVCAR-3 ähnlich schwach exprimiert (IRS =  $2,8 \pm 0,2$  vs. IRS =  $2,9 \pm 0,2$ ), es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei UWB1.289 zeigte sich eine schwache zytosolische TR $\beta$  Proteinexpression. OVCAR-3 zeigte eine starke TR $\beta$  Expression im Zytosol.



**Abbildung 18 A-D Immunzytochemischer Nachweis von TR $\beta$**

Die Proteinexpression von TR $\beta$  wurde bei den Mammakarzinom-Zelllinien (A) HCC3153 (*BRCA1* mutiert) und (B) MCF7 (*BRCA1* Wildtyp) immunzytochemisch bestimmt und mittels IRS verglichen. Analog dazu wurde die TR $\beta$  Proteinexpression der Ovarialkarzinom-Zelllinien (C) UWB1.289 (*BRCA1* mutiert) und (D) OVCAR-3 (*BRCA1* Wildtyp) verglichen.

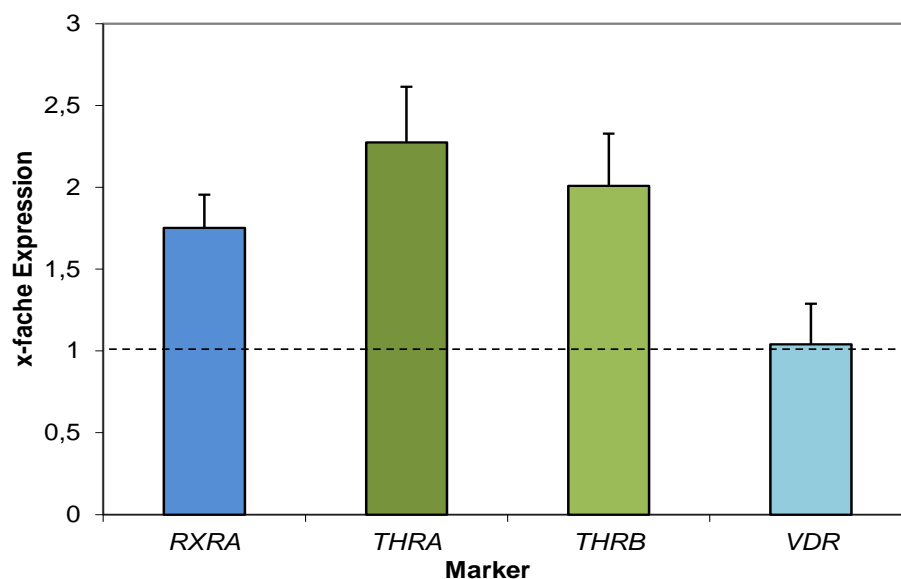
Vergrößerung 10x und 25x

## 4.2 Ergebnisse der QRT-PCR

Die quantitative Analyse der Genexpression der Thyroidhormonrezeptoren und möglicher Heterodimerisierungs-Partner wurde bei den Zelllinien mithilfe der QRT-PCR durchgeführt. Die Genexpression der Rezeptoren bei den *BRCA1* mutierten Zelllinien wurde auf Zelllinien ohne *BRCA1* Mutation bezogen.

### 4.2.1 Vergleich der Genexpression der Thyroidhormonrezeptoren bei HCC3153 und MCF7

Die *BRCA1* mutierte Mammakarzinom-Zelllinie HCC3153 wurde verglichen mit der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7, die keine Mutation im *BRCA1* Genbereich aufweist. *THRA*, *THRB*, und *RXRA* waren bei der *BRCA1* mutierten Mammakarzinom-Zelllinie hochreguliert. So zeigte sich bei HCC3153 eine 2,3 fache Expression von *THRA*, eine 2,0 fache Expression von *THRB* und eine 1,8 fache Expression von *RXRA* (jeweils  $p = 0,004$ ). Die Expression des Vitamin D Rezeptors war bei beiden Zelllinien ähnlich, es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.



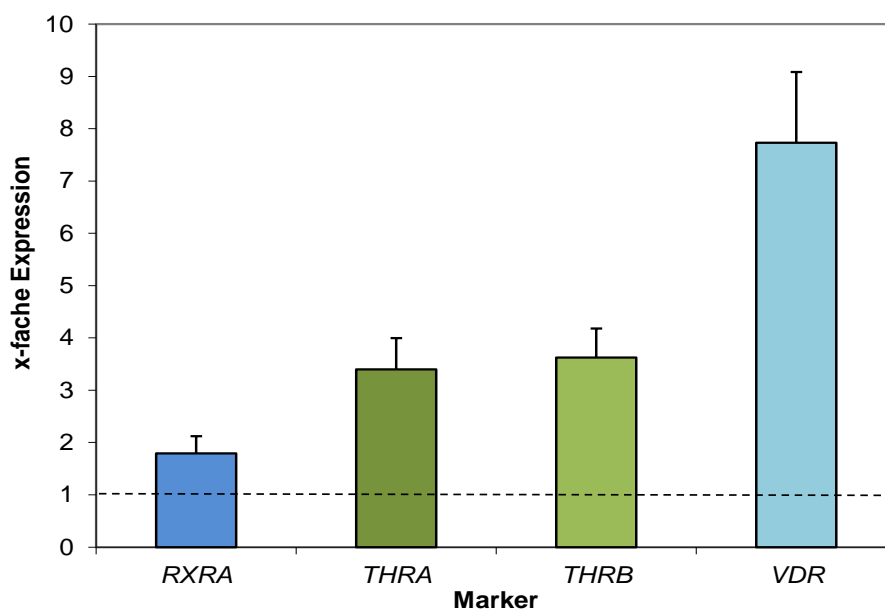
**Abbildung 19** Genexpression des Retinoid-X-Rezeptors, der Thyroidhormonrezeptoren und des Vitamin D Rezeptors bei den Mammakarzinom-Zelllinien HCC3153 (*BRCA1* mutiert) im Vergleich zu MCF7 (*BRCA1* Wildtyp)

Die Kontrolllinie bei 1 zeigt die Genexpression der entsprechenden Rezeptoren bei MCF7 an.



## 4.2.2 Vergleich der Genexpression der Thyroidhormonrezeptoren bei UWB1.289 und OVCAR-3

Bei den Ovarialkarzinom-Zelllinien wurden die *BRCA1* mutierte Zelllinie UWB1.289 mit der nicht *BRCA1* mutierten Zelllinie OVCAR-3 verglichen. *THRA*, *THRB*, *RXRA* und *VDR* waren bei der *BRCA1* mutierten Ovarialkarzinom-Zelllinie stärker exprimiert. So war die Expression von *THRA* bei UWB1.289 3,4 fach erhöht, die Expression von *THRB* 3,6 fach und die Expression des *VDR* 7,7 fach erhöht (jeweils  $p = 0,004$ ). *RXRA* zeigte eine 1,8 fach erhöhte Expression bei UWB1.289, wobei dieser Wert nicht signifikant war ( $p = 0,055$ ).



**Abbildung 20** Genexpression des Retinoid-X-Rezeptors, der Thyroidhormonrezeptoren und des Vitamin D Rezeptors bei den Ovarialkarzinom-Zelllinien UWB1.289 (*BRCA1* mutiert) im Vergleich zu OVCAR-3 (*BRCA1* Wildtyp)

Die Kontrolllinie bei 1 zeigt die Genexpression der entsprechenden Rezeptoren bei OVCAR-3 an.

## 4.3 Ergebnisse des BrdU-ELISAs

Mithilfe des BrdU-ELISAs sollte die Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die Proliferation der betrachteten Mamma- und Ovarialkarzinom-Zelllinien untersucht werden. Außerdem sollte festgestellt werden, ob Inhibitoren der Thyroidhormonre-



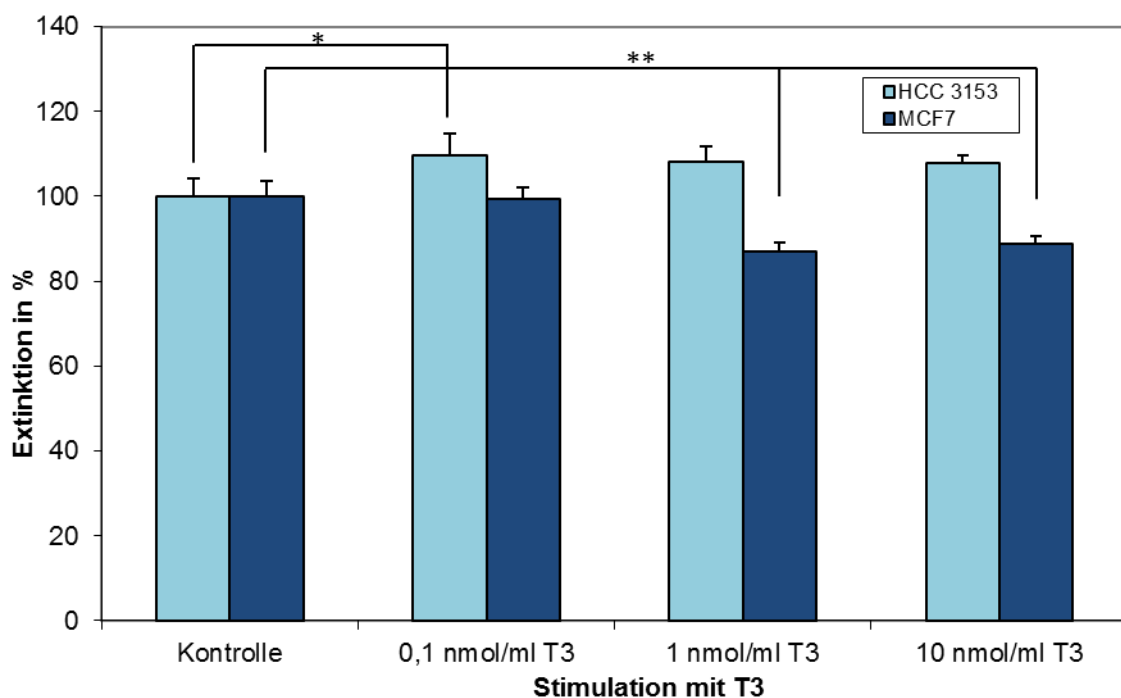
zeptoren einen proliferationshemmenden Effekt auf Mamma- und Ovarialkarzinom-Zelllinien ausüben können.

### 4.3.1 Einfluss des Schilddrüsenhormons $T_3$ auf die untersuchten Zelllinien

#### 4.3.1.1 Einfluss von $T_3$ auf Mammakarzinom-Zelllinien

Bei HCC3153 führte die Stimulation mit  $T_3$  zu einer leichten Proliferationssteigerung. Ein signifikanter Anstieg konnte jedoch nur bei 0,1 nmol/ml  $T_3$  Zugabe ermittelt werden, dort betrug die Proliferationssteigerung gegenüber der Kontrolle 9,7% ( $p = 0,049$ ).

Bei MCF7 konnte durch Stimulation mit 0,1 nmol/ml  $T_3$  keine signifikante Proliferationsänderung herbeigeführt werden. Höhere  $T_3$  Konzentrationen bewirkten jedoch eine signifikante Proliferationsinhibition ( $p < 0,040$ ).



**Abbildung 21 Vergleich der Proliferation der Mammakarzinom-Zelllinien HCC3153 (*BRCA1* mutiert) und MCF7 (*BRCA1* Wildtyp) nach Stimulation mit  $T_3$**

Darstellung von HCC3153 durch helle und von MCF7 durch dunkle Balken.

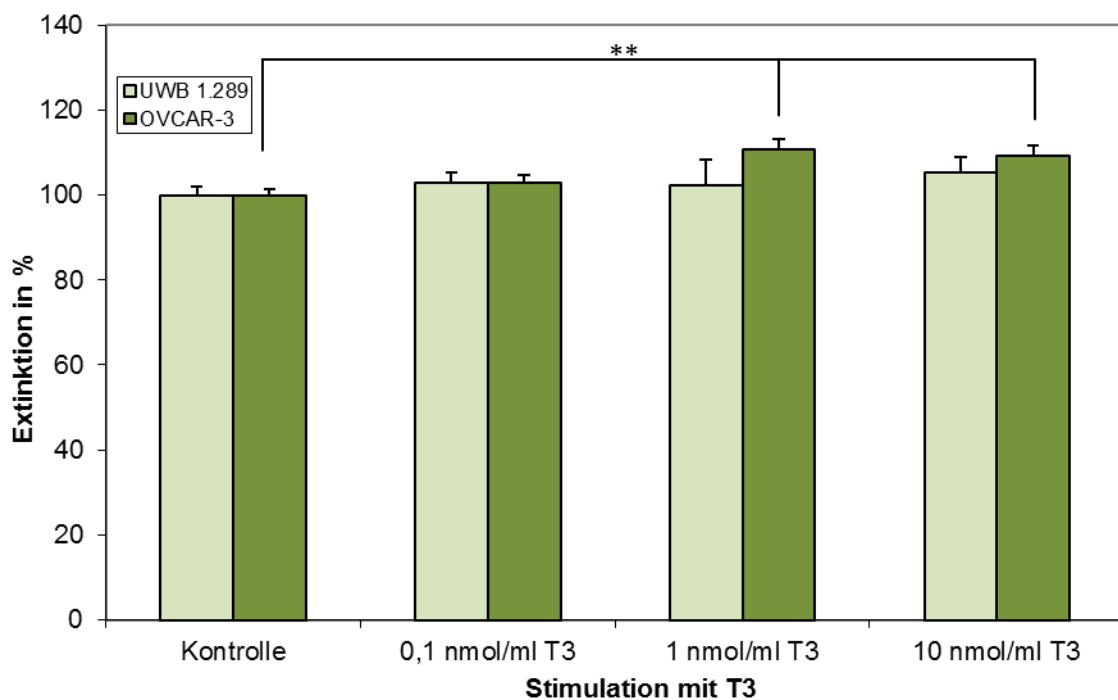
\* : ein signifikanter Unterschied wurde gemessen zwischen den Kontrollen und  $T_3$  Konzentrationen von 0,1 nmol/ml in HCC3153 Zellen

\*\* : signifikante Unterschiede wurden gemessen zwischen den Kontrollen und  $T_3$  Konzentrationen von 1,0 nmol/ml und 10 nmol/ml in MCF7 Zellen

#### 4.3.1.2 Einfluss von $T_3$ auf Ovarialkarzinom-Zelllinien

Die Stimulation mit  $T_3$  bewirkte bei der *BRCA1* mutierten Ovarialkarzinom-Zelllinie UWB1.289 keine signifikante Proliferationsänderung, tendenziell zeigte sich eine leichte Proliferationssteigerung.

Bei OVCAR-3 bewirkte  $T_3$  eine leichte Proliferationssteigerung, für Konzentrationen von 0,1 nmol/ml und 1,0 nmol/ml  $T_3$  konnten signifikante Werte ermittelt werden ( $p < 0,027$ ).



**Abbildung 22** Vergleich der Proliferation der Ovarialkarzinom-Zelllinien UWB1.289 (*BRCA1* mutiert) und OVCAR-3 (*BRCA1* Wildtyp) nach Stimulation mit  $T_3$

Darstellung von UWB1.289 durch helle und von OVCAR-3 durch dunkle Balken.

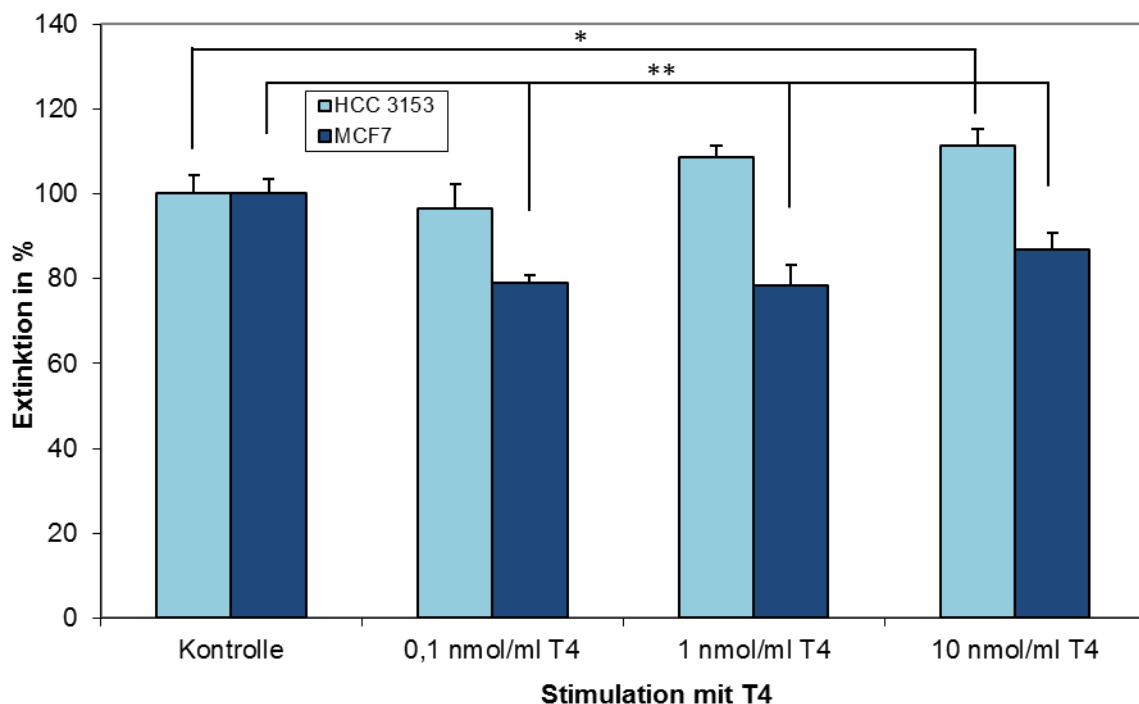
\*\* : signifikante Unterschiede wurden gemessen zwischen den Kontrollen und  $T_3$  Konzentrationen von 0,1 nmol/ml und 1,0 nmol/ml in OVCAR-3 Zellen

### 4.3.2 Einfluss des Schilddrüsenhormons $T_4$ auf die untersuchten Zelllinien

#### 4.3.2.1 Einfluss von $T_4$ auf Mammakarzinom-Zelllinien

Die *BRCA1* mutierte Mammakarzinom-Zelllinie HCC3153 reagierte auf Stimulation mit 1,0 nmol/ml und 10,0 nmol/ml  $T_4$  mit einer leichten Proliferationssteigerung. Der Proliferationsanstieg um 11,2 % bei Zugabe von 10 nmol/ml  $T_4$  war signifikant ( $p = 0,009$ ).

Bei MCF7 wirkte die Stimulation mit  $T_4$  einen leicht proliferationsinhibierend, wobei bei 10 nmol/ml  $T_4$  eine geringere Inhibition ermittelt wurde als bei 0,1 nmol/ml und 1,0 nmol/ml ( $p < 0,050$ ).



**Abbildung 23** Vergleich der Proliferation der Mammakarzinom-Zelllinien HCC3153 (*BRCA1* mutiert) und MCF7 (Wildtyp *BRCA1*) nach Stimulation mit  $T_4$

Darstellung von HCC3153 durch helle und von MCF7 durch dunkle Balken.

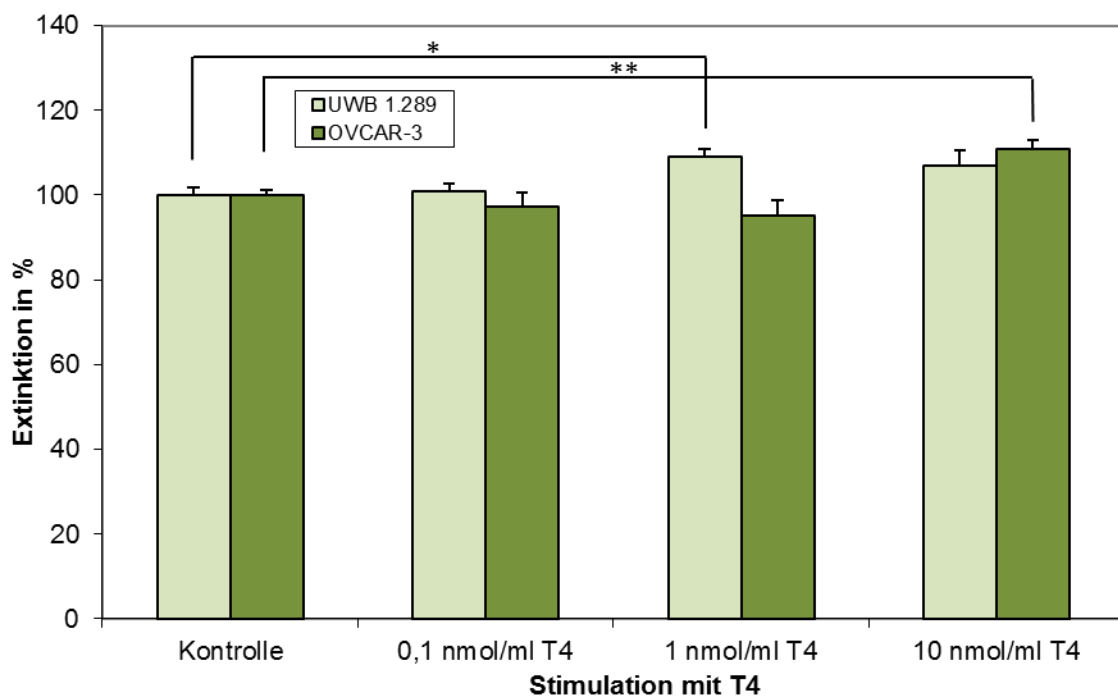
\* : ein signifikanter Unterschied wurde gemessen zwischen den Kontrollen und  $T_4$  Konzentrationen von 10 nmol/ml in HCC3153 Zellen

\*\* : signifikante Unterschiede wurden gemessen zwischen den Kontrollen und  $T_4$  Konzentrationen von 0,1 nmol/ml, 1,0 nmol/ml und 10 nmol/ml in MCF7 Zellen

#### 4.3.2.2 Einfluss von T<sub>4</sub> auf Ovarialkarzinom-Zelllinien

Die Stimulation mit T<sub>4</sub> führte bei der *BRCA1* mutierten Ovarialkarzinom-Zelllinie UWB1.289 zu einer leichten Steigerung der Zellproliferation. Die Proliferationssteigerung um 9,2% bei einer Stimulation mit 1,0 nmol/ml T<sub>4</sub> war signifikant ( $p = 0,001$ ).

Bei OVCAR-3 ergab die Stimulation mit T<sub>4</sub> bei den Konzentrationen 0,1 nmol/ml und 1,0 nmol/ml keinen signifikanten Effekt. Die Zugabe von T<sub>4</sub> zu einer Konzentration von 10 nmol/ml bewirkte eine Proliferationssteigerung um 10,7% ( $p = 0,005$ ).



**Abbildung 24** Vergleich der Proliferation der Ovarialkarzinom-Zelllinien UWB1.289 (*BRCA1* mutiert) und OVCAR-3 (Wildtyp *BRCA1*) nach Stimulation mit T<sub>4</sub>

Darstellung von UWB1.289 durch helle und von OVCAR-3 durch dunkle Balken.

\* : ein signifikanter Unterschied wurde gemessen zwischen den Kontrollen und T<sub>4</sub> Konzentrationen von 1,0 nmol/ml in UWB1.289 Zellen

\*\* : ein signifikanter Unterschied wurde gemessen zwischen den Kontrollen und T<sub>4</sub> Konzentrationen von 10 nmol/ml in OVCAR-3 Zellen

#### 4.3.3 Inhibierungsversuche mit Thyroidhormonrezeptor- Antagonisten

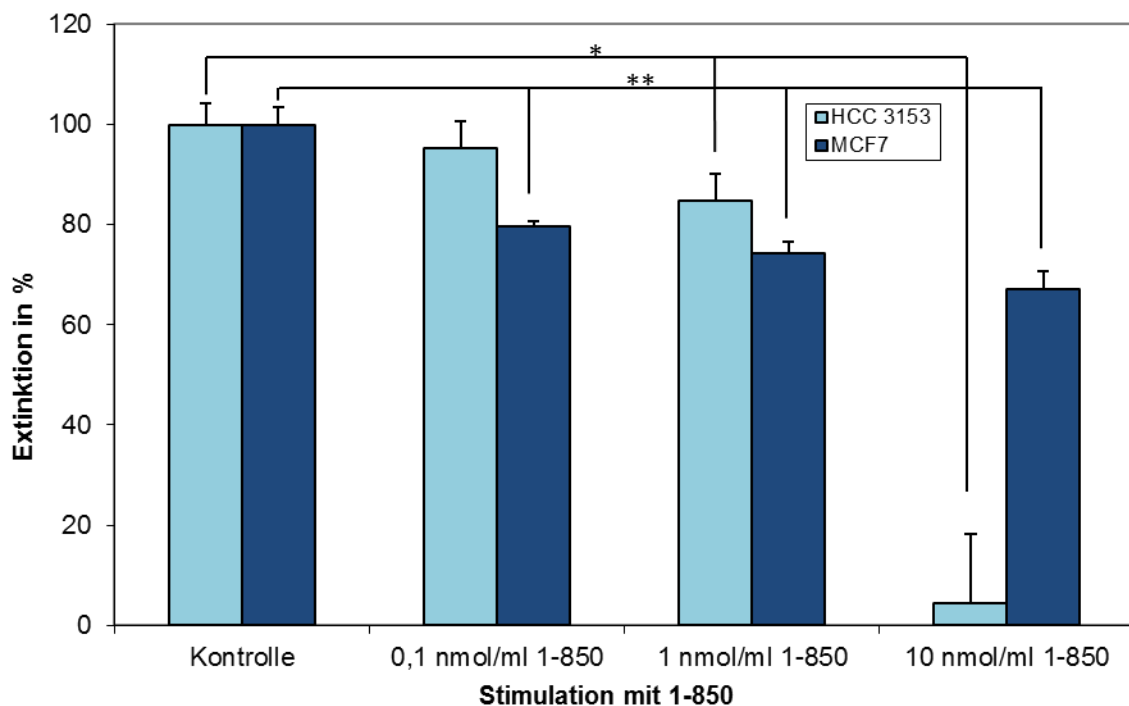
Um feststellen zu können, ob sich die Proliferation der untersuchten Mamma- und Ovarialkarzinom- Zelllinien bei Inhibierung der Thyroidhormonrezeptoren ändert, wurden die Thyroidhormonrezeptor-Antagonisten 1-850 und H6039 eingesetzt.

### 4.3.3.1 Einfluss des Thyroidhormonrezeptor-Antagonisten 1-850 auf die untersuchten Zelllinien

#### 4.3.3.1.1 Einfluss von 1-850 auf Mammakarzinom-Zelllinien

Der Einsatz des Thyroidhormonrezeptor-Antagonisten 1-850 führte bei der *BRCA1* mutierten Mammakarzinom-Zelllinie HCC3153 zu einer konzentrationsabhängigen Proliferationsinhibition. Bei Behandlung mit 1,0 nmol/ml 1-850 verringerte sich die Proliferation verglichen mit dem Kontrollwert um 15,3% ( $p = 0,017$ ). Die Behandlung mit 10 nmol/ml 1-850 führte zu einem hochsignifikanten Proliferationsrückgang um 95,5% ( $p < 0,001$ ).

Auch bei MCF7 sank die Proliferation bei Zugabe von 1-850 konzentrationsabhängig. Bei Behandlung mit 0,1 nmol/ml 1-850 verringerte sich die Proliferation um 20,4%, bei 1,0 nmol/ml um 25,6% und bei 10 nmol/ml um 33%. Der Proliferationsrückgang war signifikant (jeweils  $p = 0,001$ ).



**Abbildung 25 Vergleich der Proliferation der Mammakarzinom-Zelllinien HCC3153 (*BRCA1* mutiert) und MCF7 (Wildtyp *BRCA1*) nach Stimulation mit 1-850**

Darstellung von HCC3153 durch helle und von MCF7 durch dunkle Balken.

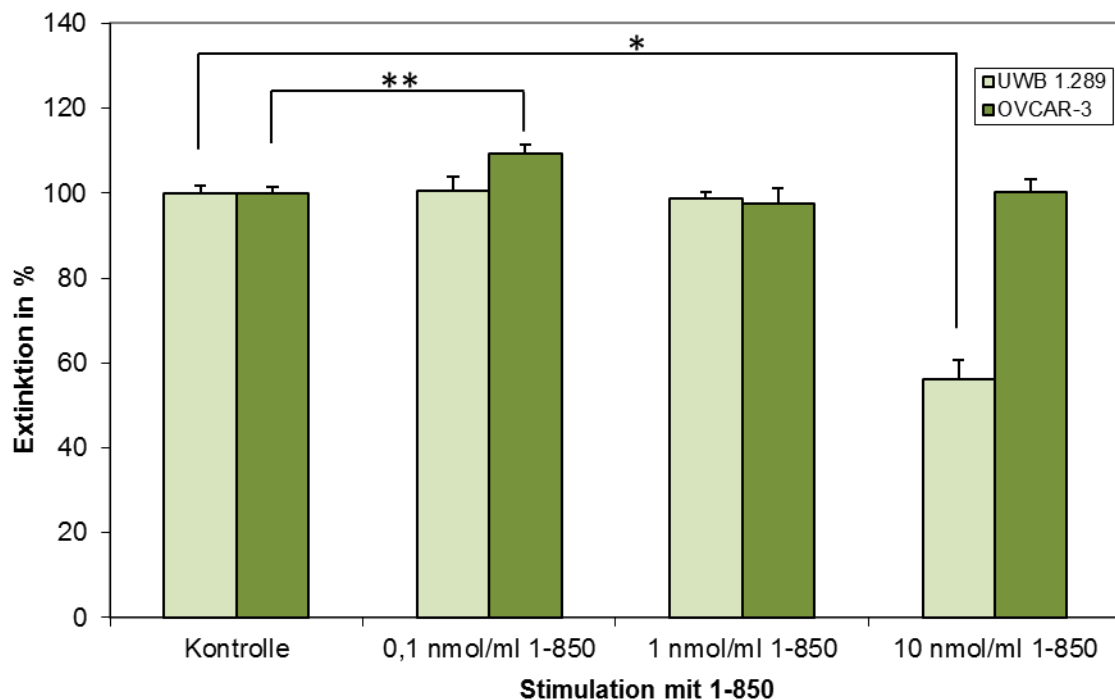
\* : signifikante Unterschiede wurden gemessen zwischen den Kontrollen und 1-850 Konzentrationen von 1,0 nmol/ml und 10 nmol/ml in HCC3153 Zellen

\*\* : signifikante Unterschiede wurden gemessen zwischen den Kontrollen und 1-850 Konzentrationen von 0,1 nmol/ml, 1,0 nmol/ml und 10 nmol/ml in MCF7 Zellen

#### 4.3.3.1.2 Einfluss von 1-850 auf Ovarialkarzinom-Zelllinien

Die Behandlung mit 1-850 senkte die Proliferation der *BRCA1* mutierten Ovarialkarzinom- Zelllinie UWB 1.289 bei einer Konzentration von 10 nmol/ml 1-850 auf 56 % des Kontrollwertes ( $p < 0,001$ ).

Bei OVCAR-3 wurde kein signifikanter Proliferationsrückgang verzeichnet, bei Zugabe von 0,1 nmol/ml 1-850 stieg die Proliferation sogar leicht an.



**Abbildung 26 Vergleich der Proliferation der Ovarialkarzinom-Zelllinien UWB1.289 (*BRCA1* mutiert) und OVCAR-3 (Wildtyp *BRCA1*) nach Stimulation mit 1-850**

Darstellung von UWB1.289 durch helle und von OVCAR-3 durch dunkle Balken.

\* : ein signifikanter Unterschied wurde gemessen zwischen den Kontrollen und 1-850 Konzentrationen von 10 nmol/ml in UWB1.289 Zellen

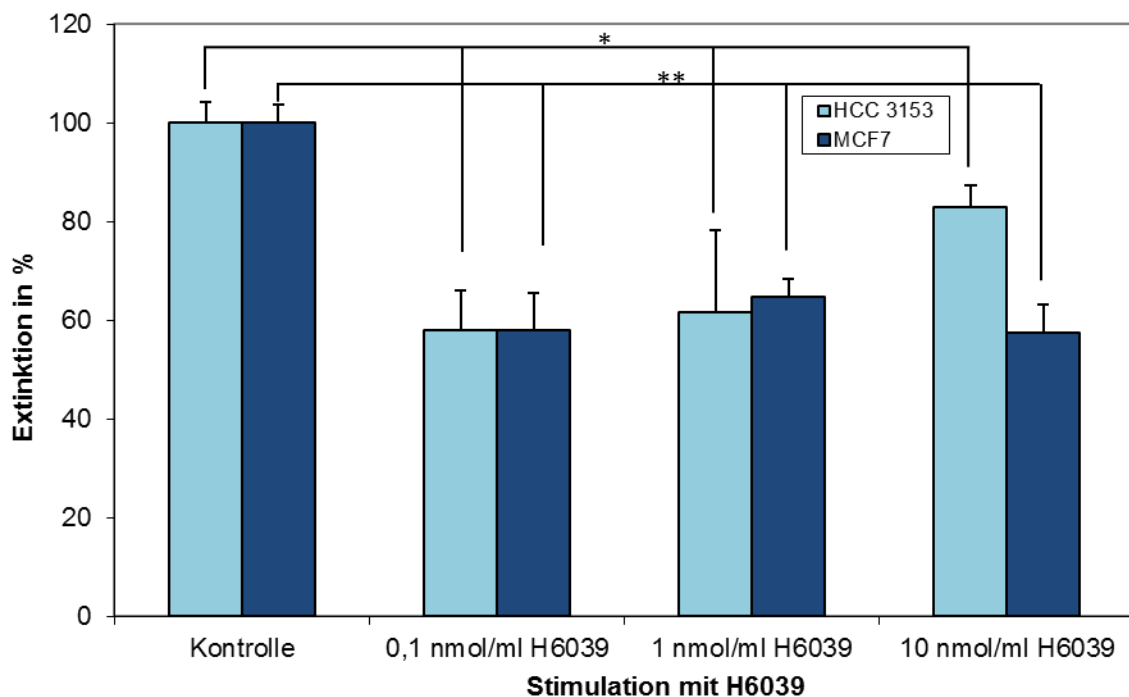
\*\* : ein signifikanter Unterschied wurde gemessen zwischen den Kontrollen und 1-850 Konzentrationen von 0,1 nmol/ml in OVCAR-3 Zellen

### 4.3.3.2 Einfluss des Thyroidhormonrezeptor $\beta$ Antagonisten H6039 auf die untersuchten Zelllinien

#### 4.3.3.2.1 Einfluss von H6039 auf Mammakarzinom-Zelllinien

Der Thyroidhormonrezeptor  $\beta$  Inhibitor H6039 senkte die Proliferation der untersuchten Mammakarzinom-Zelllinien. Bei der *BRCA1* mutierten Mammakarzinom-Zelllinie HCC3153 wurde die stärkste Inhibition bei einer Konzentration von 0,1 nmol/ml H6039 erreicht, die Proliferation sank auf 58,1% des Kontrollwertes ( $p = 0,001$ ). Durch Zugabe höherer Konzentrationen konnte kein weiterer Proliferationsrückgang erreicht werden, sondern war tendenziell verringert.

Bei MCF7 wurde bei Zugabe von 0,1 nmol/ml H6039 ein ähnlicher Proliferationsrückgang verzeichnet wie bei HCC3153, die Proliferation sank auf 58 % des Kontrollwertes ( $p < 0,001$ ). Höhere Konzentrationen H6039 bewirkten keine weitere Inhibition.



**Abbildung 27 Vergleich der Proliferation der Mammakarzinom-Zelllinien HCC3153 (*BRCA1* mutiert) und MCF7 (Wildtyp *BRCA1*) nach Stimulation mit H6039**

Darstellung von HCC3153 durch helle und von MCF7 durch dunkle Balken.

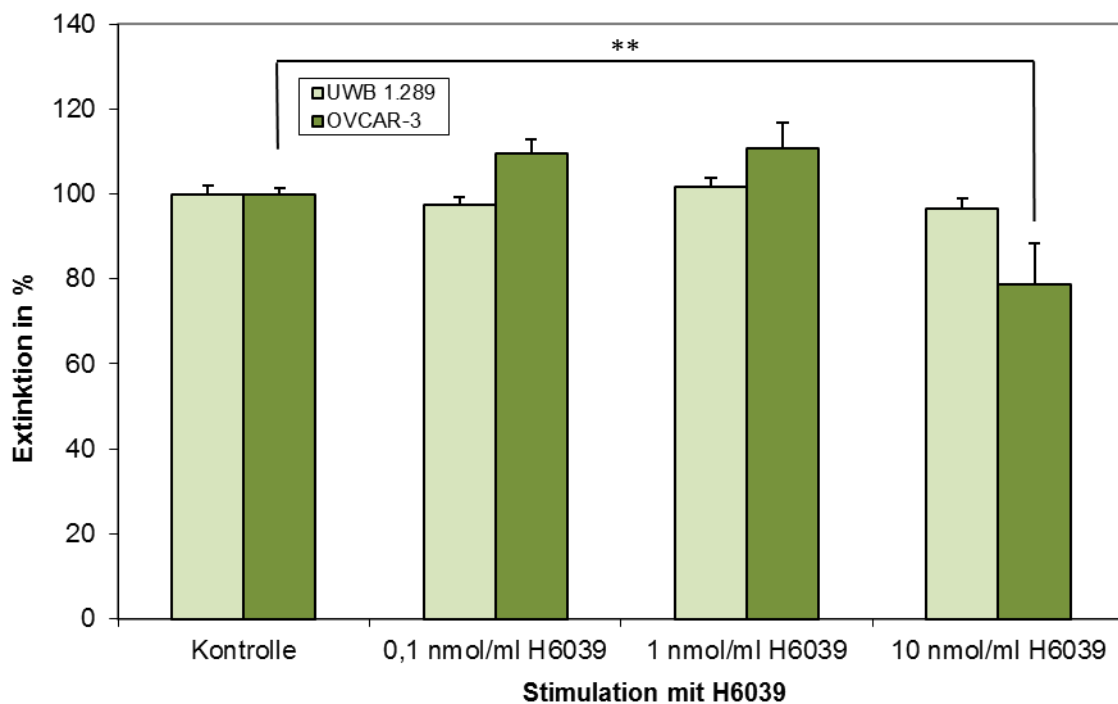
\* : signifikante Unterschiede wurden gemessen zwischen den Kontrollen und H6039 Konzentrationen von 0,1 nmol/ml, 1,0 nmol/ml und 10 nmol/ml in HCC3153 Zellen

\*\* : signifikante Unterschiede wurden gemessen zwischen den Kontrollen und H6039 Konzentrationen von 0,1 nmol/ml, 1,0 nmol/ml und 10 nmol/ml in MCF7 Zellen

#### 4.3.3.2.2 Einfluss von H6039 auf Ovarialkarzinom-Zelllinien

Der Thyroidhormonrezeptor  $\beta$  Inhibitor H6039 bewirkte bei der *BRCA1* mutierten Ovarialkarzinom-Zelllinie UWB1.289 keine signifikante Änderung der Zellproliferation.

Bei OVCAR-3 bewirkte die Zugabe von 0,1 nmol/ml und 1,0 nmol/ml tendenziell einen leichten Proliferationsanstieg. Bei Zugabe von 10 nmol/ml H6039 sank die Proliferation jedoch auf 78,6% des Kontrollwertes ( $p = 0,028$ ).



**Abbildung 28 Vergleich der Proliferation der Ovarialkarzinom-Zelllinien UWB1.289 (*BRCA1* mutiert) und OVCAR-3 (Wildtyp *BRCA1*) nach Stimulation mit H6039**

Darstellung von UWB1.289 durch helle und von OVCAR-3 durch dunkle Balken.

\*\* : ein signifikanter Unterschied wurde gemessen zwischen den Kontrollen und einer H6039 Konzentrationen von 10 nmol/ml in OVCAR-3 Zellen



## 5 Diskussion

Wenn nach genetischer Testung eine hereditäre Disposition für das Mamma- und Ovarialkarzinom aufgrund von *BRCA1* Mutation feststeht, wird die Betroffene mit drastischen Vorbeugemaßnahmen konfrontiert. Denn als wirksamste Prophylaxe gilt die Entfernung von Brust und Eierstöcken, was jedoch gravierende physische und psychische Folgen nach sich ziehen kann (Hallowell, Baylock et al. 2011). Um Prophylaxe und Therapie weniger invasiv gestalten zu können, wird nach geeigneten systemisch wirksamen Substanzen gesucht. Da *BRCA1* assoziierte Tumoren meist weder Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor noch HER2/neu exprimieren, sind gegenwärtige antihormonelle Therapien nicht anwendbar. Es ist somit sinnvoll, die biologischen Grundlagen des *BRCA1* Mechanismus weiter zu erforschen und mögliche Einflussfaktoren zu finden. Die Idee für diese Arbeit entstand, da man an der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München die Beobachtung machte, dass Patientinnen mit *BRCA1* assoziiertem Mammakarzinom oftmals an Schilddrüsenerkrankungen litten. Zudem existieren epidemiologische Studien, in denen Korrelationen zwischen thyroidalen Erkrankungen und dem Auftreten von Mamma- und Ovarialkarzinomen festgestellt wurden. Von Thyroidhormonen ist bekannt, dass sie Wachstum, Differenzierung und metabolische Prozesse bei Mammazellen fördern (Hovey, Trott et al. 2002) (Neville, McFadden et al. 2002). Eine proliferative Wirkung der Thyroidhormone auf Mammakarzinomzellen ist somit naheliegend.

Ziel dieser Arbeit war zum einen, die Expression der Thyroidhormonrezeptoren bei *BRCA1* mutierten und nicht *BRCA1* mutierten Mamma- und Ovarialkarzinomzellen in vitro zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Zum anderen sollte analysiert werden, welchen Effekt Thyroidhormone auf die Proliferation von Mamma- und Ovarialkarzinomzellen haben und ob sich deren Wirkung bei Zellen mit *BRCA1* Mutation unterscheidet. Darüber hinaus wurde untersucht, was die Inhibition der Thyroidhormonrezeptoren bei den betrachteten Zellen bewirkt.

### 5.1 Expression der Thyroidhormonrezeptoren

Für den Vergleich der Thyroidhormonrezeptor Expression bei sporadischem und *BRCA1* mutiertem Mamma- und Ovarialkarziom wurden Zellkulturen mit Zelllinien,

die jeweils einen der Fälle repräsentierten, angelegt. Die Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 wurde mit der *BRCA1* mutierten Zelllinie HCC3153 verglichen, die Ovarialkarzinom-Zelllinie OVCAR-3 wurde der *BRCA1* mutierten Zelllinie UWB 1.289 gegenübergestellt. Die Thyroidhormonrezeptor-Expression wurde auf Proteinebene mittels Immunzytochemie untersucht und nach dem semiquantitativen IRS-Score von Remmele und Stegner (Remmele and Stegner 1987) bewertet. Darüber hinaus erfolgte eine relative Quantifizierung der mRNA-Expression der Thyroidhormonrezeptoren über die QRT-PCR. Durch die immunzytochemische Analyse wurde die Proteinexpression der Thyroidhormonrezeptoren TR $\alpha$  und TR $\beta$  bei allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen. Meist war die Proteinexpression der Rezeptoren nicht auf den Zellkern beschränkt, sondern es zeigte sich auch eine zytosolische Expression. Die Proteinexpression der Thyroidhormonrezeptoren im Zytosol könnte entweder durch eine Dysfunktion der Thyroidhormonrezeptoren bei Karzinomzellen bedingt sein, oder darin begründet liegen, dass entgegen der klassischen Lehrmeinung Thyroidhormonrezeptoren auch außerhalb des Zellkerns zu finden sind (Cheng, Leonard et al. 2010). TR $\alpha$  war bei den *BRCA1* mutierten Zelllinien stärker exprimiert als bei den Zelllinien mit Wildtyp *BRCA1*. Die Proteinexpression von TR $\beta$  war bei allen Zelllinien ähnlich schwach.

Bei der QRT-PCR wurde analog zu den Ergebnissen der Immunzytochemie eine stärkere Genexpression von *THRA* bei den *BRCA1* mutierten Zelllinien im Vergleich zu den Zelllinien aus sporadischen Karzinomen gefunden. Darüber hinaus wurde eine erhöhte *THRB* Genexpression bei den *BRCA1* mutierten Zelllinien gemessen.

Es existieren experimentelle Studien zur Expression von Thyroidhormonrezeptoren beim sporadischen Mammakarzinom und bei Epithelzellen des Ovars. Conde et al. analysierten mittels Immunhistochemie und Western Blot Gewebeproben von 84 Mammatumoren (Conde, Paniagua et al. 2006). Sie stellten fest, dass Thyroidhormonrezeptoren bei Mammatumoren verglichen mit gesundem Brustepithel verstärkt im Zytoplasma lokalisiert waren und dass TR $\alpha$  besonders stark bei benignen Mammatumoren und in situ Karzinomen exprimiert war. Analog dazu wurde auch bei unseren Experimenten Thyroidhormonrezeptor-Proteinexpression im Zytoplasma der Tumorzellen festgestellt. Conde et al. schlossen aus ihren Ergebnissen, das veränderte Expressionsprofil der Thyroidhormonrezeptoren auf Proteinebene sei ein Zeichen für deren Dysregulation bei Mammatumoren. Diese Dysre-

gulation könne wiederum zur Tumorentstehung beitragen. Auch Silva et al. fanden bei einem Teil der von ihnen analysierten Mammakarzinomproben veränderte Thyroidhormonrezeptor RNA- und Proteinexpression (Silva, Dominguez et al. 2002). Nach Meinung der Autoren könne es dadurch zu abnormen Interaktionen mit anderen Proteinen kommen. Diese Interaktionen würden möglicherweise zelluläre Kontrollsysteme stören, die im Regelfall eine Bildung von Tumoren verhindern.

Thyroidhormonrezeptoren werden von den Epithelzellen des Ovars exprimiert (Rae, Gubbay et al. 2007). Bislang existieren jedoch keine Berichte darüber, ob die Expression der Thyroidhormonrezeptoren bei Ovarialtumoren verändert ist.

Die erhöhte Thyroidhormonrezeptor Expression, die im Rahmen unserer Studie bei *BRCA1* mutierten Mamma- und Ovarialkarzinom-Zelllinien festgestellt wurde, deutet auf einen Zusammenhang zwischen *BRCA1* Mechanismus und Thyroidhormonrezeptoren hin. *BRCA1* gehört zu den Kontrollproteinen des Zellzyklus (Deng 2006). Da bei defektem *BRCA1* die Kontrolle des Zellzyklus ungenügend abläuft, könnte die Thyroidhormonrezeptor Überexpression die stimulierende Wirkung der Thyroidhormone verstärken und dadurch ungebremstes Zellwachstum fördern.

## **5.2 Genexpression der Heterodimerisierungspartner der Thyroidhormonrezeptoren**

Neben der Thyroidhormonrezeptor Expression wurde mittels QRT-PCR auch die Genexpression weiterer nukleärer Rezeptoren bei den betrachteten Zelllinien untersucht. Hintergrund dieser Untersuchungen war, dass die Thyroidhormon vermittelte Transkription durch Interaktionen und Heterodimerbildung mit anderen nukleären Rezeptoren moduliert wird (Cheng, Leonard et al. 2010). Thyroidhormonrezeptoren binden TREs (Thyroid responsive elements) der DNA meist als Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR). RXR ist ubiquitär vorhanden und bildet Heterodimere mit weiteren Partnern, somit wird Crosstalk (gegenseitige Beeinflussung) mit weiteren nukleären Rezeptoren ermöglicht. So wurde vom Crosstalk der Thyroidhormonrezeptoren mit dem Vitamin-D-Rezeptor (VDR) und weiteren Retinsäurerezeptoren berichtet. Die Heterodimerisierung der Thyroidhormonrezeptoren mit RXR verstärkt deren Bindung an TRE, die Ansprechbarkeit auf  $T_3$  und die Transkriptionsrate. Zudem vermutet man, dass die Fähigkeit der Thyroidhormonre-

zeptoren, sehr viele Nukleotidsequenzen zu binden, durch die Heterodimerisierung mit RXR ermöglicht wird (Yen, Ando et al. 2006). Darüber hinaus wurden Interaktionen der Thyroidhormonrezeptoren mit dem Vitamin D Rezeptor über den gemeinsamen Corepressor TRAP/DRIP beschrieben (Leo and Chen 2000).

Ein weiterer Grund für eine möglichst breite Expressionsanalyse nukleärer Rezeptoren bei den zu untersuchenden Zellen beruht auf der Fähigkeit dieser Rezeptoren, auch andere als für sie vorgesehene Liganden zu binden (Jin and Li 2010). So erlauben die hydrophoben Eigenschaften ihrer Ligandenbindungstaschen Interaktion mit mehreren lipophilen Liganden. Sie reagieren auf verschiedene Liganden unterschiedlich und wechseln sie je nach äußeren Bedingungen. Dabei kann es zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen, wenn ein Ligand mit einem für ihn nicht vorgesehenen Rezeptor interagiert. Somit ist es prinzipiell möglich, dass Thyroidhormone neben den Thyroidhormonrezeptoren noch weitere nukleäre Rezeptoren beeinflussen.

Bei Mammakarzinomen ist nicht nur das Expressionsprofil der Thyroidhormonrezeptoren, sondern auch das von RXR und VDR verändert. So werden RXR und VDR in Mammakarzinomzellen stärker exprimiert als im gesunden Brustgewebe (Conde, Paniagua et al. 2004) (Friedrich, Rafi et al. 2003). Auch beim Ovarialkarzinom spielt die Expression von RXR (Zhang, Holmes et al. 2000) und VDR (Ahonen, Zhuang et al. 2000) eine wichtige Rolle. Es wurde eine erhöhte Expression des VDR bei Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zu gesundem Ovarialepithel gefunden (Villena-Heinsen, Meyberg et al. 2002). Auf genetischer Ebene hat man herausgefunden, dass das Vorliegen von rs2228570, eines seltenen Polymorphismus des *VDR*, besonders für junge Frauen ein erhöhtes Ovarialkarzinomrisiko bedeutet (Lurie, Wilkens et al. 2011).

Wir stellten bei den *BRCA1* mutierten Zelllinien eine höhere Genexpression von *RXR* und *VDR* fest als bei den nicht *BRCA1* mutierten Zelllinien. Somit waren bei der QRT-PCR nicht nur die Thyroidhormonrezeptoren höher exprimiert, sondern auch deren mögliche Heterodimerisierungspartner. Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass die maligne Entartung der Zellen nach *BRCA1* Verlust durch bestimmte nukleäre Rezeptoren beeinflusst wird.

Ein interessanter Nebenfund ist die hohe Genexpression des *VDR* bei *BRCA1* mutierten Ovarialkarzinomzellen. Wie oben aufgeführt, gibt es ein seltenes Allel des *VDR*, das mit erhöhtem Ovarialkarzinomrisiko besonders bei jüngeren Frauen

assoziiert ist. Auch bei *BRCA1* Mutationsträgerinnen können Ovarialkarzinome im jungen Alter auftreten. Ob ein Zusammenhang zwischen dem seltenen Allel des *VDR* und *BRCA1* besteht, könnte in Zukunft durch genetische Assoziationsstudien geklärt werden.

### **5.3 Einfluss der Schilddrüsenhormone auf sporadische und *BRCA1* mutierte Mamma- und Ovarialkarzinome**

Um den Einfluss der Schilddrüsenhormone auf die Proliferation von Mamma- und Ovarialkarzinomen mit *BRCA1* Mutation in vitro untersuchen zu können, wurden die *BRCA1* mutierten Zelllinien mit 3,3',5-Triiod-L-thyronin ( $T_3$ ) und Thyroxin ( $T_4$ ) stimuliert. Für einen Vergleich der Thyroidhormonwirkung bei *BRCA1* mutierten Karzinomzellen mit Zellen aus sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen wurden entsprechende Zelllinien ebenfalls mit  $T_3$  und  $T_4$  stimuliert. Als Untersuchungsmethode diente der colorimetrische BrdU-ELISA der Firma Roche. Bei dieser Methode wird BrdU (5-Brom-2'-Desoxyuridin), ein synthetisches Thymidin-Analogon, während der Zellreplikation anstelle des Thymidins in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Dieses Verfahren gilt als sehr präzise Methode zur Bestimmung der mitogenen Aktivität von Zellen bei Stimulanzengabe, da es die de novo DNA-Synthese misst (Hughes and Mehmet 2003). Anstelle von BrdU kann radioaktiv markiertes Thymidin verwendet werden mit anschließender Quantifizierung mittels Radioaktivitätsmessung. Da die Ergebnisse bei BrdU und [ $^3H$ ] Thymidin Inkorporation äquivalent bezüglich Sensitivität und Spezifität sind (Hughes and Mehmet 2003), BrdU aber Vorteile bei der Handhabung bietet, wurde letzteres verwendet. Wir wählten einen colorimetrischen BrdU-ELISA, bei dem die farbigen Reaktionsprodukte über eine Absorptionsmessung im Spektralphotometer (ELISA-Reader) quantifiziert werden. Ein Nachteil ist hierbei, dass der Bereich, in dem lineare Messungen möglich sind, begrenzt ist. So konnte mittels Chemilumineszenzmessung bei stimulierten Prostatakarzinom-Zelllinien ein höherer Proliferationsanstieg verzeichnet werden als mit der colorimetrischen Methode (Profit and Unteregger 2001).

Die physiologische Plasmakonzentration für  $T_4$  liegt etwa bei  $1,1 \times 10^{-7}$  M, für  $T_3$  etwa bei  $2 \times 10^{-9}$  M (Löffler, Petrides et al. 2007). Wichtige genomische Aktivität zeigt  $T_3$  jedoch erst ab Konzentrationen von  $10^{-8}$  bis  $10^{-7}$  M (Cheng, Leonard et al.

2010), außerdem sollte bei unseren Experimenten eine hyperthyroidale Situation simuliert werden. Somit wählten wir höhere Thyroidhormon-Konzentrationen als im Plasma üblich sind.

Die Stimulation mit  $T_3$  zu einer Konzentration von  $10^{-7}$  M ergab bei der nicht *BRCA1* mutierten Mammmakarzinom-Zelllinie MCF7 im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Proliferationsänderung. Bei der *BRCA1* mutierten Mammmakarzinom-Zelllinie HCC3153 zeigte sich hingegen eine leichte Proliferationssteigerung um etwa 10 %. Höhere  $T_3$  Konzentrationen bewirkten bei HCC3153 keinen weiteren Proliferationsanstieg, bei MCF7 war die Proliferation leicht rückläufig. Die Stimulation mit  $T_4$  bewirkte bei MCF7 einen leichten Proliferationsrückgang, wohingegen bei HCC3153 die Proliferation leicht anstieg. Somit hatten die Thyroidhormone bei der *BRCA1* mutierten Mammmakarzinom-Zelllinie tendenziell einen Zellwachstums-fördernden, bei der Zelllinie ohne *BRCA1* Mutation einen leicht hemmenden Effekt. Die proliferative Wirkung der Thyroidhormone auf *BRCA1* mutierte Mammmakarzinomzellen ist ein Indiz dafür, dass Thyroidhormone zur Entstehung und Progression *BRCA1* assoziierter Karzinome beitragen. Ursächlich hierfür könnten Dysfunktionen der Thyroidhormonrezeptoren bei *BRCA1* assoziierten Karzinomen sein, was wiederum zu oben genannten Ergebnissen passt, wonach die Thyroidhormonrezeptoren bei *BRCA1* assoziierten Karzinomen überexprimiert sind.

Mögliche Zusammenhänge zwischen den Thyroidhormonen und der Entwicklung und Progression von Mammmakarzinomen werden seit Langem kontrovers diskutiert. Der britische Chirurg George Beatson behandelte 1895 erstmals ein rezidivierendes Mammmakarzinom mit bilateraler Oophorektomie und der Gabe von Thyroidextrakten (Beatson 1896). Auch wenn der Erfolg seiner Behandlung eher auf die Oophorektomien als auf die Thyroidhormongabe zurückgeführt wird (Thomson 1902) (Love and Philips 2002), bleibt die Frage nach der Thyroidhormonwirkung auf Mammmakarzinome. Experimentelle Studien liefern bislang unterschiedliche Ergebnisse, sowohl von proliferativer als auch antiproliferativer Wirkung der Thyroidhormone wurde berichtet. Tang et al. stimulierten MCF7 Zellen für 24 Stunden mit  $10^{-7}$  M  $T_4$  und verzeichneten mittels [ $^3H$ ] Thymidin Inkorporation einen Proliferationsanstieg der Zellen (Tang, Lin et al. 2004). Wir hatten bei derselben Konzentration  $T_4$  bei MCF7 einen leichten Proliferationsrückgang gemessen, allerdings un-

terschied sich Methode, Stimulationsdauer und Zusammensetzung des Zellkulturmediums. Die von Tang et al. verwendete Bestimmung der [ $^3\text{H}$ ] Thymidin Inkorporation zur Messung der Proliferation gilt als probate Methode, jedoch ist sie zeitlich sensibel, die Messung sollte erst nach 30-40 Stunden erfolgen (Hughes and Mehmet 2003). Eine Stimulationsdauer von 24 Stunden ist möglicherweise etwas zu kurz gewählt. In unserem Fall lag die Stimulationsdauer bei 48 Stunden. Die Ursache für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von Tang et. al. und unseren Ergebnissen könnte somit durch die unterschiedliche Stimulationsdauer bedingt sein. Möglicherweise kommt es bei Thyroidhormonzugabe zu einer anfänglichen Proliferationssteigerung, die nach 24 Stunden messbar ist, später aber rückläufig ist. Grund hierfür könnte sein, dass die Thyroidhormone initial das Zellwachstum durch Rezeptorbindung steigern, später jedoch ein Sättigungseffekt eintritt (Löffler, Petrides et al. 2007). Tang et al. verwendeten für ihre Stimulationsversuche serumfreies Medium. Das könnte ebenfalls ein Grund für die von Tang et al. festgestellte Proliferationssteigerung sein. So steigerte bei Alini et al. die Thyroidhormonzugabe bei Chondrozyten im serumfreien Medium die Zellreifung, wohingegen diese Effekte bei Serum enthaltendem Medium nicht auftraten (Alini, Kofsky et al. 1996). Bei unseren Stimulierungsversuchen enthielt das Medium bei Proben und Kontrollen zu 10 % fetales Kälberserum, um der physiologischen Situation möglichst nahe zu kommen. Fetales Kälberserum enthält die im physiologischen Milieu vorkommenden Hormone, somit kann es sein, dass dadurch der proliferative Effekt der Thyroidhormone bereits abgedeckt wird. Die durch serumfreies Medium entstehenden artifiziellen Verhältnisse könnten dazu führen, dass das plötzliche Angebot Wachstum fördernder Hormone proliferativ wirkt. Umgekehrt könnte bei unseren Versuchen das Hormonangebot im Serum dazu führen, dass die Thyroidhormon sensiblen Rezeptoren bereits gesättigt sind und die Hormonzugabe keine weitere Proliferationssteigerung bewirkt. Zudem ist bei der Verwendung von fetalem Kälberserum zu bedenken, dass die enthaltenen Hormonkonzentrationen nur in Durchschnittswerten angegeben werden können und naturgemäß nicht konstant sind. Auch durch die unterschiedliche Spezies und das fetale Stadium kann es zu Verzerrungen kommen. So liegt die durchschnittliche  $\text{T}_4$  Konzentration im Kälberserum unter der humanen Plasmakonzentration (Lindl 2002). Die durchschnittliche  $\text{T}_3$  Konzentration im fetalen Kälberserum entspricht bei der hier verwendeten Verdünnung von 1:10 der beim Menschen physiologischen Situation. Optimal für Sti-

mulierungsversuche mit Hormonen wäre wohl nicht das Weglassen des Serums, sondern die Verwendung von Humanserum. Dieser Ansatz könnte in Zukunft zur Klärung des Einflusses erhöhter Thyroidhormon-Konzentration auf Mammakarzinomzellen beitragen.

Hall et al. führten Experimente zur kombinierten Wirkung von  $17\beta$ -Estradiol ( $E_2$ ) und  $T_3$  an Mammakarzinom-Zelllinien durch. Sie stellten bei der Stimulation mit  $10^{-7}$  M  $T_3$  bei MCF7 eine leichte Proliferationssteigerung (ca. 20 %) fest (Hall, Salazar et al. 2008). Wir konnten bei gleicher Konzentration keine Änderung der Proliferation feststellen. Dabei unterschieden sich Methodik, Stimulationsdauer und Mediumzusammensetzung der Stimulationsversuche. Hall et al. verwendeten zur Proliferationsbestimmung CyQuant Assays, welche jedoch ähnlich präzise Ergebnisse wie  $[^3H]$ Thymidin Inkorporations Messungen liefern (Jones, Gray et al. 2001). Möglicherweise war unsere Methode, die BrdU Inkorporation colorimetrisch zu bestimmen, nicht sensitiv genug, um einen leichten Proliferationsanstieg zu registrieren (Profit and Unteregger 2001). Die Stimulationsdauer war bei Hall et al. mit sechs bis acht Tagen wesentlich länger als bei unseren Experimenten gewählt. Somit besteht die Möglichkeit, dass durch die längere Stimulationsdauer Effekte auftraten, die nach 48 Stunden noch nicht messbar waren. Wie Tang et al. gebrauchten Hall et al. serumfreies Medium, dadurch können die zuvor genannten Effekte auftreten. Auch die experimentellen Studien von Cestari et al. widmeten sich der Frage, inwiefern  $E_2$  und  $T_3$  bei Mammakarzinom-Zelllinien interagieren (Cestari, Figueiredo et al. 2009). Dazu wurden Stimulationsversuche mit  $T_3$  an der ER $\alpha$  transfizierten Mammakarzinom-Zelllinie S30 durchgeführt. Die Zellzahl wurde mittels Viabilitätstest WST-1 und Zellzählung bestimmt, was in Kombination verlässliche Ergebnisse liefert (Hughes and Mehmet 2003). Stimulationsdauer waren drei Tage, das Medium enthielt zu 5% CS-FBS. Cestari et al. stellten bei einer  $T_3$  Konzentration von  $10^{-8}$  M bei S30 einen Proliferationsrückgang fest. Dieses Ergebnis ist ein Indiz dafür, dass Thyroidhormone auf verschiedene Mammakarzinom-Zellarten unterschiedliche Auswirkungen haben können. Sar et al. stellten mittels Durchflusszytometrie fest, dass  $T_3$  durch Unterdrückung der Expression des Seneszenz Markers SMP30 Apoptose bei MCF7 Zellen auslöst. Die Konzentration von  $T_3$  war mit  $10^{-5}$  M allerdings sehr hoch gewählt (Sar, Peter et al. 2011). Martinez et al. untersuchten das Proliferationsverhalten verschiedener Mammakarzinom-Zelllinien bei Thyroidhormonstimulation (Martinez, Ruan et al. 2000)



(Martinez, Ruan et al. 2000). Stimuliert wurde mit Konzentrationen im Bereich von  $10^{-6}$  M bis  $10^{-5}$  M. Die Proliferation wurde über [ $^3$ H]Thymidin Inkorporation gemessen, Inkubationszeit waren 6-18 Stunden und es wurde serumfreies Medium verwendet. Bei der Mehrzahl der Mammakarzinom-Zelllinien führten  $T_3$  und  $T_4$  zu einer Abnahme der Proliferation. Bei der Mammakarzinom-Zelllinie T-47D wirkten niedrige Thyroidhormon Konzentrationen ( $\leq 10^{-6}$  M) stimulierend, höhere inhibierend auf das Zellwachstum. Analog dazu verzeichneten auch Hall et al. einen Proliferationsanstieg bei T-47D Zellen bei Stimulation mit gleicher  $T_3$  Konzentration (Hall, Salazar et al. 2008). Bei den Studien von Martinez et al. ist jedoch zu bedenken, dass die Stimulationsdauer etwas kurz gewählt war und sehr hohe Thyroidhormon-Konzentrationen zum Einsatz kamen. Analog zu unseren Ergebnissen wirkten hohe Thyroidhormon-Konzentrationen inhibierend auf MCF7. Bei niedrigeren  $T_3$  Konzentrationen konnten wir keinen Einfluss auf die Proliferation von MCF7 ermitteln, was jedoch methodisch bedingt sein könnte.

Zusammengefasst lässt sich aus bisherigen Studien ableiten, dass physiologische Thyroidhormon-Konzentrationen die Proliferation der Mammakarzinomzellen in vitro tendenziell fördern, wohingegen sehr hohe Konzentrationen inhibierend wirken. Dass bei *BRCA1* mutierten Mammakarzinomzellen selbst sehr hohe Thyroidhormon Konzentrationen proliferativ wirken, könnte mit der Überexpression der Thyroidhormonrezeptoren zusammenhängen. Darüber hinaus könnte die Affinität der Rezeptoren für Thyroidhormone verändert sein.

Auch epidemiologische Studien können zur Klärung des Zusammenhanges zwischen Thyroidhormonen und Mammakarzinomen beitragen, da sie die Häufigkeit von Schilddrüsenerkrankungen bei Mammakarzinom-Patientinnen untersuchen.

Christofanilli et al. führten dazu eine retrospektive Studie an 1088 Mammakarzinom-Patientinnen und 1136 Kontrollen durch (Cristofanilli, Yamamura et al. 2005). Sie stellten fest, dass Mammakarzinom-Patientinnen zu 57 % seltener an primärer Hypothyreose erkrankt waren als die Kontrollen. Daraus schlossen sie, primäre Hypothyreose würde das Risiko, am Mammakarzinom zu erkranken, reduzieren. Bei dieser Studie muss jedoch bedacht werden, dass alle an primärer Hypothyreose erkrankten Patientinnen Substitutionstherapie erhielten, also gegebenenfalls nicht die Hypothyreose selbst, sondern die korrekte Einstellung der Thyroidhormone protektiv wirkt. In der Studie von Cengiz et al. litten 78 % der Mammakarzinom-

Patientinnen an Schilddrüsenerkrankungen (Cengiz, Bozkurt et al. 2004). Die Tumorerkrankungen der Mammakarzinom-Patientinnen mit thyroidalen Dysfunktionen waren schwerwiegender. Zudem wiesen die Mammakarzinom-Patientinnen erhöhte Werte freies  $T_3$  auf. Die Anzahl der Mammakarzinom-Patientinnen ( $n = 136$ ) und die Kontrollen ( $n = 68$ ) in dieser Studie war zu gering, um daraus allgemeingültige Aussagen abzuleiten. Nichtsdestoweniger weisen die erhöhten Werte an freiem  $T_3$  bei den Mammakarzinom-Patientinnen darauf hin, dass  $T_3$  auch in vivo proliferativ auf Mammakarzinomzellen wirkt.

Saraiva et al. stellten ebenfalls häufiger Schilddrüsenerkrankungen bei Mammakarzinom-Patientinnen fest als bei den Kontrollen (Saraiva, Figueiredo et al. 2005). Den größten Anteil bildeten dabei die subklinischen Hyperthyreosen. Zusätzlich waren Thyroidhormon- und Östrogenwerte bei postmenopausalen Mammakarzinom-Patientinnen erhöht. Das könnte ein Indiz dafür sein, dass ein Ungleichgewicht von Schilddrüsen- und Östrogenwerten Tumorwachstum fördert. Im Wesentlichen bestätigt die Studie von Saraiva et al. die Ergebnisse von Cengiz et al., ist jedoch mit einer Anzahl von 26 Mammakarzinom-Patientinnen und 22 Kontrollen zu klein, um verlässliche Aussagen zu liefern. Tosovic et al. analysierten mittels prospektiver Studie, ob der Wert freies  $T_3$  bei Brustkrebspatientinnen verändert ist (Tosovic, Bondeson et al. 2010). Sie stellten bei postmenopausalen Patientinnen eine positive Korrelation zwischen  $T_3$  Werten und Brustkrebs fest. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass es sich um eine Koinzidenz handeln könnte, da sowohl Mammakarzinome als auch Schilddrüsenerkrankungen häufiger bei älteren Patientinnen auftreten. Zudem ist die Anzahl der Patientinnen ( $n = 173$ ), die im Rahmen der Studie ein Mammakarzinom entwickelten, zu klein, um allgemeingültige Aussagen zu treffen.

Den zuvor genannten Studien widerspricht die prospektive Studie von Kuijpers et al., die eine Assoziation zwischen Mammakarzinomen bei postmenopausalen Frauen und dem Vorliegen von Hypothyreose fand (Kuijpers, Nyklictek et al. 2005). Da innerhalb dieser Studie jedoch nur 61 Mammakarzinomfälle auftraten, sind diese Ergebnisse nicht repräsentativ für die Gesamtbevölkerung. In der groß angelegten Studie von Weiss et al. wurden Mammakarzinom-Patientinnen und Kontrollen retrospektiv zu Allgemeinerkrankungen befragt, darunter auch zu Schilddrüsenerkrankungen (Weiss, Brinton et al. 1999). Es konnte kein signifikant erhöhtes Risiko für Schilddrüsenerkrankungen bei Mammakarzinom-Patientinnen

festgestellt werden. Für die Aussagekraft dieser Studie spricht, dass eine große Anzahl an Patientinnen ( $n = 2173$ ) und Kontrollen ( $n = 1990$ ) befragt wurde. Nachteilig ist, dass keine Überprüfung der Angaben durch Hausarztbefragungen oder Erhebung von Laborwerten erfolgte. Zudem wurden lediglich Frauen unter 55 Jahren befragt, mögliche Korrelation bei postmenopausalen Patientinnen konnten somit nicht gefunden werden. Simon et al. führten ebenfalls eine sehr große Studie zur Ermittlung der Allgemeinerkrankungen bei Mammakarzinom-Patientinnen durch, wobei hier Frauen jeden Alters befragt wurden (Simon, Tang et al. 2002). In dieser Studie fand man ebenfalls keine Assoziation zwischen Schilddrüsenerkrankungen und Mammakarzinomen. Hauptkritikpunkt ist auch hier, dass die durch Befragung der Patientinnen gewonnenen Erkenntnisse nicht durch Befragung der Hausärzte oder Erhebung von Laborwerten verifiziert wurden.

Insgesamt lassen sich aus den bisher durchgeführten epidemiologischen Studien keine klaren Aussagen zum Zusammenhang von Mammakarzinom- und Schilddrüsenerkrankungen ableiten. Groß angelegte Befragungsstudien fanden meist keinen Zusammenhang. Kleinere, aber durch Laboruntersuchungen gestützte Studien registrierten mehr Schilddrüsenerkrankungen bei den Mammakarzinom-Patientinnen als bei den Kontrollen. Die Ergebnisse der kleineren, laborgestützten Studien ähneln tendenziell experimentellen Studien, wonach leicht erhöhte Thyroidhormon Konzentrationen proliferativ auf Mammakarzinomzellen wirken.

Zum Einfluss der Thyroidhormone auf *BRCA1* mutierte Mammakarziome existieren nach unserem Kenntnisstand weder experimentelle noch epidemiologische Studien. Es wäre ein interessanter Ansatzpunkt für zukünftige epidemiologische Studien, hereditären Brustkrebs separat zu betrachten, um mögliche Einflussfaktoren wie etwa thyroideale Erkrankungen zu finden.

Da Betroffene von *BRCA1* Mutationen neben dem Mammakarzinomrisiko auch ein erhöhtes Ovarialkarzinomrisiko aufweisen, führten wir auch Stimulationsversuche mit Thyroidhormonen an der *BRCA1* mutierten Ovarialkarzinom-Zelllinie UWB1.289 durch. Als Vergleich diente die nicht *BRCA1* mutierte Zelllinie OVCAR-3. Die Stimulation mit  $T_3$  bewirkte bei UWB1.289 keine signifikante Änderung der Proliferation, tendenziell stieg die Proliferation leicht an. Bei OVCAR-3 bewirkte die Stimulation mit  $10^{-7}$  M  $T_3$  keine signifikante Proliferationssteigerung, bei höheren  $T_3$

Konzentrationen stieg die Proliferation um maximal 11 %. Die Zugabe von  $10^{-6}$  M  $T_4$  steigerte bei UWB1.289 die Proliferation um etwa 9 %. Bei OVCAR-3 wurde eine Proliferationssteigerung von 11 % bei Zugabe von  $10^{-5}$  M  $T_4$  registriert. Somit zeigten die Thyroidhormone weder bei der *BRCA1* mutierten Ovarialkarzinom-Zelllinie noch bei Zelllinie mit Wildtyp *BRCA1* deutliche Auswirkungen. Einziger Hinweis auf einen Einfluss der Thyroidhormone auf *BRCA1* mutierte Ovarialkarzinomzellen war die leicht erhöhte Proliferation von UWB1.289 bei der Stimulation mit  $T_4$ .

Martinez et al. konnten bei der Stimulation der Ovarialkarzinom-Zelllinie OVCAR-3 mit Thyroidhormonen keinen Proliferationsanstieg feststellen (Martinez, Ruan et al. 2000). Mögliche Erklärungen für Abweichungen sind in diesem Fall analog zu den bei den Mammakarzinomzellen aufgeführten Gründen. Rae et al. untersuchten die Wirkung von  $T_3$  auf Epithelzellen des Ovars. Sie fanden heraus, dass  $T_3$  eine entzündungsfördernde Wirkung auf diese Zellen ausübt (Rae, Gubbay et al. 2007). Ihr Ergebnis bezogen sie auf die Entzündungshypothese zur Entstehung eines Ovarialkarzinoms, wonach durch häufige Ovulationen Entzündungs-assoziierte DNA Schäden auftreten, die wiederum zur Karzinogenese führen könnten.

Ness et al. führten eine epidemiologische Studie zu möglichen Risikofaktoren für das Ovarialkarzinom durch (Ness, Grisso et al. 2000). Bei den Ovarialkarzinom-Patientinnen fanden sie mehr Fälle von Hyperthyreose als bei den Kontrollen. Für diese Studie spricht, dass viele Ovarialkarzinom-Patientinnen ( $n = 767$ ) und Kontrollen ( $n = 1367$ ) befragt wurden. Weitere Studien, die eine Assoziation zwischen dem Ovarialkarzinom und Hyperthyreose bestätigen, existieren gemäß unseren Kenntnissen noch nicht.

Aufgrund der geringen Datenlage lässt sich keine eindeutige Aussage treffen, ob Thyroidhormone zur Entstehung und Progression der Ovarialkarzinome beitragen.

Zur weiteren Klärung der Thyroidhormonwirkung auf Mamma- und Ovarialkarzinome wäre es sinnvoll, weitere Stimulierungsversuche mit Thyroidhormonen an verschiedenen Zelllinien durchzuführen. Dabei sollte auch mit niedrigen Thyroidhormon Konzentrationen stimuliert werden und es sollten sehr sensitive Methoden zur Proliferationsmessung zum Einsatz kommen.

## 5.4 Einfluss der Thyroidhormonrezeptor-Antagonisten auf sporadische und *BRCA1* mutierte Mamma- und Ovarialkarzinomzellen

Um herauszufinden, ob die Inhibition der Thyroidhormonrezeptoren bei den betrachteten Zelllinien Auswirkungen auf deren Zellproliferation hat, stimulierten wir die Zelllinien mit selektiven Modulatoren der Thyroidhormonrezeptoren (STORMs). Vorteil der STORMs gegenüber den meist bei Inhibierungsversuchen eingesetzten Thyroidhormon-Analoga ist, dass STORMs speziell gegen die Thyroidhormonrezeptoren gerichtet sind (Flamant, Gauthier et al. 2007). Bei medikamentösem Einsatz könnten so Nebenwirkungen, die bei Thyroidhormon-Analoga auftreten, vermieden werden. Denn anders als bei Thyroidhormon-Analoga erfolgt durch STORMs keine Veränderung des Plasmaspiegels der Thyroidhormone. Unerwünschte Wechselwirkungen mit anderen Rezeptoren können dadurch ebenfalls eingeschränkt werden. Die Wirkung der STORMs beruht darauf, dass die Interaktion zwischen den Thyroidhormonrezeptoren und den Coaktivatoren blockiert wird. Diese Interaktion ist essenziell für die Hormonwirkung an den nukleären Rezeptoren, denn die Coaktivatoren sorgen dafür, dass die Hormon-Rezeptor-Komplexe an die DNA binden und sich dadurch die Transkription bestimmter Gene ändert. Zum einen wurde der von Schapira et al. im ComputermodeLL entwickelte Thyroidhormonrezeptor-Antagonist 1-850 ausgewählt (Schapira, Raaka et al. 2003). Zum anderen kam der von Arnold et. al identifizierte Thyroidhormonrezeptor-Antagonist H6039 zum Einsatz, welcher die Interaktion zwischen TR $\beta$  und dem Coaktivator SRC-2 verhindert (Arnold, Estebanez-Perpina et al. 2005).

Die Proliferation der Zelllinien nach Gabe der Thyroidhormonrezeptor-Antagonisten bestimmten wir mit Hilfe des colorimetrischen BrdU Proliferationsassay. Diese Methode liefert exakte Ergebnisse bei Inhibierungsversuchen (Profit and Unteregger 2001).

Die Inhibition der Thyroidhormonrezeptoren mittels 1-850 führte bei beiden Mammakarzinom-Zelllinien zu einem signifikanten und konzentrationsabhängigen Proliferationsrückgang. Bei MCF7 sank die Proliferation um maximal 33 % bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  M 1-850. Dahingegen sank bei derselben Konzentration 1-850 die Proliferation der *BRCA1* mutierten Mammakarzinom-Zelllinie um 95 %. Das beinahe vollständige Erliegen der Zellproliferation durch Inhibition der Thy-

roidhormonrezeptoren mit 1-850 bei der *BRCA1* mutierten Mammakarzinom-Zelllinie ist ein starker Hinweis dafür, dass bei *BRCA1* mutierten Mammakarzinomen eine Dysregulation der Thyroidhormonrezeptoren vorliegt.

Bei der Ovarialkarzinom-Zelllinie OVCAR-3 zeigte sich kein Proliferationsrückgang durch 1-850. Dahingegen zeigte sich bei der *BRCA1* mutierten Ovarialkarzinom-Zelllinie ein signifikanter Rückgang der Zellproliferation um 44 %.

Somit wirkte die Thyroidhormonrezeptor Blockade in vitro vornehmlich auf *BRCA1* mutierte Mamma- und Ovarialkarzinomzellen. Dieses Ergebnis könnte im Zusammenhang mit der erhöhten Thyroidhormonrezeptoren Expression bei den *BRCA1* mutierten Tumorzelllinien stehen. Die erfolgreiche Wachstumshemmung *BRCA1* assoziierter Tumorzellen durch den TR-Antagonist 1-850 in vitro lässt darauf hoffen, dass die Substanz auch in vivo entsprechende Wirkung zeigt. Als nächster Schritt könnte die antiproliferative Wirkung von 1-850 an *BRCA1* defizienten Mäusen getestet werden. So könnten auch toxische Effekte dieser Substanz auf den Organismus ausgeschlossen werden.

Durch Inhibition von TR $\beta$  mittels H6039 sank die Proliferation beider Mammakarzinom-Zelllinien um maximal 42 %. Bei der *BRCA1* mutierten Ovarialkarzinom-Zelllinie zeigte sich kein Proliferationsrückgang, bei OVCAR-3 sank die Proliferation um maximal 21%. Da sich bei der Inhibition von TR $\beta$  kaum Unterschiede zwischen *BRCA1* mutierten und nicht *BRCA1* mutierten Zellen zeigten, ist ein Zusammenhang zwischen TR $\beta$  und dem *BRCA1* Mechanismus fraglich.

Aufgrund der antiproliferativen Wirkung von H6039 auf Mammakarzinomzellen ist diese Substanz jedoch ein möglicher Kandidat für hormonelle Therapien, somit sollte ihre Wirksamkeit in weiteren Studien überprüft werden.

Mit dem Konzept der antihormonellen Krebstherapie mittels Inhibition der Thyroidhormonwirkung befassen sich auch Rebbaa et al. (Rebbaa, Chu et al. 2008).

Die Autoren behandelten verschiedene Karzinom-Zelllinien mit dem Thyroidhormon-Analogen Tetrac. Tetrac blockiert die Wirkung der Thyroidhormone nicht direkt an den Thyroidhormonrezeptoren, sondern am Membranrezeptor Integrin  $\alpha\text{v}\beta 3$ . Dadurch wird die MAPK (Mitogen-activated protein kinase) vermittelte Aktivierung der Thyroidhormonrezeptoren inhibiert, von der vermutet wird, dass sie die Proliferation von Tumorzellen anregt. Rebbaa et al. erzielten durch Tetrac bei allen

untersuchten Zelllinien, darunter MCF7, eine antiproliferative Wirkung. Darüber hinaus wirkte Tetrac auch dann inhibitorisch, wenn die Tumorzellen bereits gegen das Chemotherapeutikum Doxorubicin resistent waren.

Somit lässt der Erfolg der Thyroidhormonrezeptor-Antagonisten in vitro darauf hoffen, dass diese künftig als weitere Möglichkeit der antihormonellen Therapie beim Mammakarzinom zur Verfügung stehen werden.

## **5.5 Interaktionen zwischen den Thyroidhormonrezeptoren und *BRCA1***

Der Zusammenhang zwischen den Thyroidhormonrezeptoren, dem *BRCA1* Mechanismus und der Entstehung von Mamma- und Ovarialkarzinomen könnte durch Dysfunktionen gemeinsamer Coaktivatoren bedingt sein. Wichtige Coaktivatoren der Thyroidhormonrezeptoren sind die Steroidhormonrezeptor Coaktivatoren SRC-1, SRC-2 und SRC-3 (Cheng, Leonard et al. 2010).

Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass das SRC-3 Gen besonders stark in Oocyten und im Mammaepithel exprimiert wird (Xu, Liao et al. 2000). Darüber hinaus konnten bei Mamma- und Ovarialkarzinomen erhöhte Expressionen von SRC-3 nachgewiesen werden (Anzick, Kononen et al. 1997). Daher wird der SRC-3 Coaktivator auch als AIB1 (amplified in breast cancer I) bezeichnet. Besonders wenn Mammakarzinome einen Östrogenrezeptor negativen Status aufweisen, was charakteristisch für *BRCA1* assoziierte Karzinome ist, bedeutet die SRC-3 Überexpression eine schlechte Prognose des Tumors (Lee, Lee et al. 2011).

Die korrekte Funktion des SRC-3 scheint beim *BRCA1* Mechanismus eine wichtige Rolle zu spielen. So fanden Rebbeck et al. heraus, dass bestimmte SRC-3 Genotypen das Risiko von *BRCA1*-Mutationsträgerinnen, am Mammakarzinom zu erkranken, signifikant erhöhen (Rebbeck, Wang et al. 2001). Auf Proteinebene ist bekannt, dass SRC-3 einen Komplex mit 53BP1 (p53 binding protein 1) bildet (Corkery, Thillainadesan et al. 2011). Dieser Komplex ist wiederum an der Regulation der *BRCA1* Genexpression beteiligt (Rauch, Zhong et al. 2005).

Auch für Östrogen abhängige Signalwege ist die korrekte Funktionsweise von SRC-3 wichtig. So reduziert das Abschalten der SRC-3 Funktion bei MCF7 Zellen die Östrogen abhängige Zellproliferation (List, Lauritsen et al. 2001). Im Umkehr-

schluss müsste die Überexpression von SRC-3 die Östrogen abhängige Proliferation von Mammazellen anregen. Eine übermäßige Östrogenstimulation kann bei Mammazellen zur malignen Entartung führen (Doisneau-Sixou, Sergio et al. 2003). Interaktionen zwischen BRCA1- und Östrogen abhängigen Signalwegen sind bekannt (Li, Xiao et al. 2007), wobei der zugrunde liegende Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Interaktionen zwischen den Thyroidhormonrezeptoren und BRCA1 könnten direkt durch SRC-3 bedingt sein. Da SRC-3 ein allgemeiner Coaktivator nukleärer Rezeptoren ist, verstärkt seine Überexpression wahrscheinlich nicht nur das Signal der Östrogenrezeptoren, sondern auch der Thyroidhormonrezeptoren. Die durch SRC-3 verstärkten Reize der Östrogen- und Thyroidhormone könnten bei *BRCA1* mutierten Zellen Tumorbildung auslösen, da diese aufgrund ihrer Mutation besonders anfällig für mitogene Reize sind. Diese proliferativen Reize können möglicherweise durch Blockade der Östrogen- und Thyroidhormonrezeptoren inhibiert werden. So könnte erklärt werden, warum die Inhibition der Thyroidhormonrezeptoren die Zellproliferation von *BRCA1* mutierten Tumorzellen einschränkt.

Alternativ könnte der Einfluss auf die Thyroidhormonrezeptoren auf indirektem Wege durch die von SRC-3 vermittelte Aktivierung der Östrogenrezeptoren zustande kommen. Die gegenseitige Beeinflussung der Thyroidhormon- und Östrogenrezeptoren wurde von mehreren Forschungsgruppen festgestellt (Nogueira and Brentani 1996) (Hall, Salazar et al. 2008).

Zusammengefasst spielt SRC-3 eine wichtige Rolle sowohl als Coaktivator nukleärer Rezeptoren als auch als Regulator von *BRCA1*. Ob die Überexpression von SRC-3 Fehler bei den Östrogen- und Thyroidhormon abhängigen Signalwegen auslöst, die wiederum die Entstehung *BRCA1*-assoziierter Tumoren begünstigen, muss durch weitere Experimente geklärt werden.

Bei unseren Experimenten war aufgefallen, dass besonders der Thyroidhormonrezeptor-Antagonist 1-850 die Proliferation *BRCA1* mutierter Tumorzellen inhibiert.

Diese Substanz hatte bei Schapira et al. erfolgreich die T<sub>3</sub> Bindung an TR $\alpha$  bei der humanen Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa inhibiert, sowie die TR $\alpha$  und TR $\beta$  Aktivität bei der Ratten-Hypophysen-Zelllinie GH4C1 verhindert (Schapira, Raaka et al. 2003). Da der von uns eingesetzte selektive TR $\beta$ -Antagonist H6039 geringere inhi-



historische Wirkung auf *BRCA1* mutierte Tumorzellen als 1-850 zeigte, ist anzunehmen, dass für eine Inhibition dieser Zellen die Blockade des TR $\alpha$  nötig ist.

Möglicherweise ist hierfür eine Ursache auf genetischer Ebene zu finden. Dafür würde sprechen, dass die Gene *BRCA1* und *THRA* auf demselben Chromosomenarm lokalisiert sind. So liegt die zytogenetische Lokalisation von *THRA* bei 17q21.1 (OMIM 2012), die von *BRCA1* bei 17q21.31 (OMIM 2012).

Da Futreal et al. bei Mammakarzinomzellen Deletionen im Bereich von *THRA* fanden, stellten sie die Hypothese auf, dass *THRA* möglicherweise dem *BRCA1* Gen entspricht (Futreal, Soderkvist et al. 1992). Bei weiteren Experimenten fanden sie jedoch keine Punktmutationen im Bereich von *THRA* (Futreal, Cochran et al. 1994). Auch in genomweiten Assoziationsstudien wurden bislang keine Mutationen oder Polymorphismen des *THRA* bei *BRCA1* Mutationsträgerinnen festgestellt (Barnes and Antoniou 2012). Es werden jedoch laufend neue modifizierende Gene entdeckt, somit ist die Existenz eines entsprechenden Polymorphismus prinzipiell möglich.

Aus histopathologischer Sicht fällt auf, dass *BRCA1* assoziierte Tumorzellen den Bruststammzellen ähnlich sind (van der Groep, van der Wall et al. 2011) und *THRA* besonders stark in der Entwicklungsphase exprimiert wird (Fraichard, Chassande et al. 1997). So weisen die meisten *BRCA1* mutierten Tumorzellen den basalen Phänotyp auf, das heißt sie exprimieren kein ER, PR und HER2/neu. Liu et al. konnten in vitro und am Mausmodell zeigen, dass die *BRCA1* Expression erforderlich ist für die Differenzierung von ER negativen Bruststammzellen zu ER positiven luminalen Zellen (Liu, Ginestier et al. 2008). Zudem ist der Stammzellmarker ALDH1 (Aldehyd Dehydrogenase 1) bei *BRCA1* assoziierten Mammakarzinomzellen signifikant erhöht (Heerma van Voss, van der Groep et al. 2011).

Da der *BRCA1*-Mechanismus wichtig für DNA-Reparaturprozesse ist, führt der Verlust der *BRCA1* Funktion vermutlich zur Anhäufung genetisch instabiler Bruststammzellen (Liu, Ginestier et al. 2008). Falls weitere mutagene Ereignisse erfolgen, sind diese Zellen prädestiniert für maligne Entartung. Solch ein mutagener Reiz könnte durch Thyroidhormone, die in der Regel das Zellwachstum fördern, ausgeübt werden.

Im Mausmodell wurde gezeigt, dass TR $\alpha$  in der Entwicklungsphase vor TR $\beta$  exprimiert wird und die Regulierung der Thyroidhormone vornimmt (Fraichard, Chassande et al. 1997). Bei Stammzellen des Gehirns wird die wachstumsfördernde Wirkung der Thyroidhormone von TR $\alpha$  vermittelt (Lemkine, Raj et al. 2005). Die Blockade von TR $\alpha$  führt bei Neuroblasten zum Ausbleiben des Proliferationsreizes (Lezoualc'h, Seugnet et al. 1995).

Analog dazu könnte TR $\alpha$  auch bei den Stammzellen der Brust entscheidend für die Regulation der Thyroidhormon vermittelten Wachstums- und Reifungsprozesse sein. Somit könnte die antiproliferative Wirkung des selektiven Thyroidhormonrezeptor-Antagonisten 1-850 bei *BRCA1* mutierten Tumorzellen dadurch erklärt werden, dass *BRCA1* mutierte Tumoren aus Bruststammzellen bestehen, deren Proliferation TR $\alpha$  abhängig ist.

Insgesamt sind somit mehrere Zusammenhänge zwischen *BRCA1* und den Thyroidhormonrezeptoren denkbar und liefern interessante Ansatzpunkte für zukünftige Forschung.

## 5.6 Schlussfolgerung

Wir konnten in unseren Experimenten zeigen, dass die Expression der Thyroidhormonrezeptoren bei *BRCA1* mutierten Zellen verändert ist. Die Ergebnisse der Immunzytochemie und der QRT-PCR zeigten eine erhöhte Protein- und Genexpression der Thyroidhormonrezeptoren bei *BRCA1* mutierten Tumorzellen. Die Thyroidhormone übten tendenziell eine stärkere proliferative Wirkung auf *BRCA1* mutierte Mammakarzinomzellen als auf Zellen ohne *BRCA1* Mutation aus. Darüber hinaus erzielten wir eine starke antiproliferative Wirkung bei *BRCA1* mutierten Zellen durch den Einsatz des Thyroidhormonrezeptor-Antagonisten 1-850. Diese Ergebnisse sprechen für einen Zusammenhang zwischen dem *BRCA1* Mechanismus und den Thyroidhormonrezeptoren.

## 6 Zusammenfassung

Mamma- und Ovarialkarzinome nehmen aufgrund ihrer Häufigkeit eine zentrale Rolle in der Tumorforschung ein. Etwa 5-10 % der Mamma- und Ovarialkarzinome sind hereditär bedingt. Davon gehen 20-40 % auf Mutationen der sogenannten Brustkrebsgene *BRCA1/2* zurück.

Da *BRCA1* assoziierte Karzinome in der Regel weder ER, PR noch Her-2/neu exprimieren, sind gegenwärtige antihormonelle Therapien meist wirkungslos. Deswegen wird nach geeigneteren Medikamenten zur Therapie und Prophylaxe gesucht. Die Idee für diese Arbeit entstand aufgrund einer Beobachtung an der Frauenklinik der LMU, wonach Patientinnen mit *BRCA1* assoziierten Karzinomen häufig an Schilddrüsenerkrankungen litten. Somit war Ziel dieser Arbeit, die Wirkung der Thyroidhormone auf *BRCA1* assoziierte Tumoren in vitro zu überprüfen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob sich die Inhibition der Thyroidhormonrezeptoren antiproliferativ auf *BRCA1* mutierte Tumorzellen auswirkt.

Für die Experimente wurden Zelllinien aus sporadischen und *BRCA1* mutierten Mamma- und Ovarialkarzinomen kultiviert. Als Vertreter des sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinoms wurden MCF7 und OVCAR-3 gewählt. Dem standen die *BRCA1* mutierten Zelllinien HCC3153 und UWB1.289 gegenüber.

Die Proteinexpression der Thyroidhormonrezeptoren (TR)  $\alpha$  und  $\beta$  wurde mittels Immunzytochemie untersucht und mithilfe des semiquantitativen IRS-Scores von Remmele und Stegner ausgewertet. Mithilfe QRT-PCR wurde die Genexpression der Thyroidhormonrezeptoren bei den Zelllinien quantitativ analysiert. Darüber hinaus wurde die Genexpression möglicher Heterodimerisierungspartner der Thyroidhormonrezeptoren (*RXR*, *VDR*) untersucht.

Um den Einfluss der Thyroidhormone auf die Zelllinien zu messen, wurden diese für 48 Stunden mit  $T_3$  und  $T_4$  stimuliert. Die Zellproliferation wurde mittels ELISA über die BrdU-Inkorporation bestimmt. Analog dazu wurden Inhibierungsversuche mit selektiven Thyroidhormonrezeptor-Antagonisten durchgeführt. Es kamen die Thyroidhormonrezeptor-Antagonisten 1-850 und H6039 zum Einsatz.

Die Immunzytochemie zeigte signifikant höhere Proteinexpressionen von TR $\alpha$  bei *BRCA1* mutierten Tumorzellen. Die Analyse der Expression der Thyroidhormonrezeptoren auf mRNA-Ebene ergab signifikant erhöhte Werte bei den *BRCA1* mutierten Zelllinien. Zusätzlich waren *RXR* und *VDR* bei den *BRCA1* mutierten Zelllinien

stärker exprimiert. Die Stimulation mit  $T_3$  und  $T_4$  bewirkte bei den *BRCA1* mutierten Mammakarzinomzellen tendenziell mehr Zellwachstum als bei Zellen ohne *BRCA1* Mutation. Die Inhibierungsversuche mittels TR-Antagonist 1-850 zeigten einen signifikanten Rückgang der Zellproliferation bei den *BRCA1* mutierten Zellen. 1-850 zeigte auch antiproliferative Effekte bei MCF7, allerdings weniger deutlich als bei den *BRCA1* mutierten Mammakarzinomzellen. Der TR $\beta$ -Antagonist H6039 zeigte inhibitorische Wirkung bei allen Mammakarzinom-Zelllinien, wobei der antiproliferative Effekt schwächer ausfiel als bei 1-850.

Die Ergebnisse weisen auf einen Zusammenhang zwischen dem *BRCA1* Mechanismus und den Thyroidhormonrezeptoren hin. Besonders die antiproliferative Wirkung des TR-Antagonisten 1-850 sollte durch weitere Experimente überprüft werden. Möglicherweise ist diese Substanz als gezielte antihormonelle Therapie bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen einsetzbar.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

$\pm x$	$\pm$ Standardfehler des Mittelwerts
M	molare Masse
n	Anzahl
nx	n fach konzentriert
A	
Abb.	Abbildung
ABC-Methode	Avidin-Biotinkomplex-Peroxidase-Methode
AEV	Avian erythroblastosis retrovirus
ALDH1	Aldehyd Dehydrogenase 1
AF-1/2	Aktivierungs- Funktion 1/2
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATCC	American Type Culture Collection
B	
BARD1	<i>BRCA1</i> associated RING domain
BET	brusterhaltende Therapie
<i>BRCA1</i>	<i>Breast Cancer 1</i> ; deutsch: Brustkrebsgen 1
BrdU	5-Brom-2'-Desoxyuridin
BRIP1	<i>BRCA1</i> interacting protein C-terminal helicase 1
C	
CBP/p300	CERB-binding protein/E1A binding protein
cDNA	complementary DNA
CHEK2	Checkpoint kinase 2
CoA	Coaktivator
CoR	Corepressor
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CS-FBS	charcoal-stripped fetal bovine serum
D	
D1/2/3	Deiodinase 1/2/3

---

DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Östrogenrezeptor
F	
FCS	fetales Kälberserum
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
H	
[ <sup>3</sup> H]	Tritium
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HRE	Hormone Responsive Element
I	
Ig	Immunglobulin
IRS	immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner
K	
Kb	Kilobase
Konz.	Konzentration
L	
LBD	Ligand-Binding Domain

---

LOH	Loss of Heterozygosity
M	
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MGB	minor groove binder
mRNA	messenger RNA
N	
NR	Nukleäre Rezeptoren deutsch: Kernrezeptoren
N-terminal	Amino-terminal
NCoR	nuklear receptor corepressor
P	
p53	Protein 53
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PP	Prozentsatz positiv gefärbter Zellen
PR	Progesteronrezeptor
Q	
QRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
R	
RAD50	RAD50 homologue
RAR	retinoid acid receptor
RING	Really Interesting New Gene
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time Polymerasekettenreaktion
RXR	Retinoid-X-Rezeptor

## S

SI	Färbeintensität
SMP30	Senescence marker protein-30
SMRT	silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor
SRC	Steroidhormonrezeptor Coaktivator
STORM	selective thyroid receptor modulator

## T

T <sub>3</sub>	3,3',5-Triiodo-L-Thyronin
<i>THR</i>	Thyroidhormonrezeptorgen
TR	Thyroidhormonrezeptor
TRH	Thyrotropin releasing Hormon
TRAP/DRIP	Schilddrüsenhormonrezeptor-assoziiertes Protein/Vitamin-D-Rezeptor-interagierendes Protein
TRE	thyroid hormone responsive element
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
T75	Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )
T <sub>4</sub>	L-Thyroxin

## U

UICC	Union Internationale Contre le Cancer
------	---------------------------------------

## V

VDR	Vitamin-D-Rezeptor
-----	--------------------

## W

WHO	World Health Organisation
-----	---------------------------



## 8 Materialliste

### Zelllinien

Name	Ursprungsgewebe	BRCA1-Genotyp	Bezugsquelle
HCC3153	Mammakarzinom	mutiert	ATCC
MCF7	Mammakarzinom	Wildtyp	ECACC
UWB1.289	Ovarialkarzinom	mutiert	ATCC
OVCAR-3	Ovarialkarzinom	Wildtyp	ATCC

### Zellkultur

Chemikalien	Bezugsquelle
DMEM/ F-12 w/o L-Glutamine	Biochrom AG - Berlin
Cell Culture Freezing Medium – DMSO	Gibco - USA
Aqua dest. steril	Wyeth Pharma GmbH - Münster
FCS Gold (fetales Kälberserum)	PAA Laboratories GmbH - Austria
PBS-Dulbecco w/o $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$	Biochrom AG - Berlin
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Biochrom AG - Berlin
Trypan Blue Solution (0,4 %)	Sigma-Aldrich - USA
Alkohol (70 %)	Apothekenbedarf der LMU - München
<b>Antibiotika/Antimykotika</b>	
Penicillin/Streptomycin (10000µg/ml)	Biochrom AG - Berlin
Amphotericin B (250µg/ml)	Biochrom AG - Berlin
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Falcon Becton Dickinson Labware - USA
Pipetten	Falcon Becton Dickinson Labware - USA
Pipettenspitzen	Falcon Becton Dickinson Labware - USA
sterile Tubes	Falcon Becton Dickinson Labware - USA
Microtubes	Eppendorf - Hamburg
Zellscraper	Sarstedt - USA
Neubauer Zählkammer	Assistent - Sondheim
Objektträger	Menzel GmbH & Co KG - Braunschweig
quadriPERM® Zellkulturgefäß	Sigma-Aldrich - Steinheim
<b>Geräte</b>	
Zentrifuge	Eppendorf - Hamburg
“Pipett-Boy”	Eppendorf - Hamburg
Gefrierschrank (-20°)	Siemens - München
Gefrierschrank (-80°)	Thermo Electron - Langenselbold

Lichtmikroskop

Diaplan Leitz - Wetzlar

**Zusammensetzung des Nährmediums für die Zellkultur**

DMEN/FCS

500ml DMEN

+ 50ml FCS

+ 5ml antibiotische Lösung

+ 5ml antimykotische Lösung

**Immunzytochemie****Antikörper**Anti-Thyroid Hormone Receptor  $\alpha_{1+2}$   
(polyclonal, rabbit)**Bezugsquelle**

Abcam - USA

Anti-Thyroid Hormone Receptor  $\beta$   
(polyclonal, rabbit)

Zytomed Systems - Berlin

**Kit**

Vectastain Elite ABC-Kit rabbit IgG

Vector Laboratories - USA

**Chemikalien**

PBS-Dulbecco

Biochrom AG - Berlin

Ethanol

Apothekenbedarf der LMU - München

Methanol

Merck - Darmstadt

Digitonin (1mg/ml)

Sigma-Aldrich - Steinheim

AEC-Farbstoff

Dako GmbH - Hamburg

Hämalaun

Apothekenbedarf der LMU - München

Aquatex

Merck - Darmstadt

Deckgläser

Menzel - Braunschweig

**Geräte/Software**

Lichtmikroskop

Diavert Leitz - Wetzlar

digitale Kamera

JVC - Japan

Software für Mikroskop

Diskus - Königswinter

**RNA-Isolation****Kit**NucleoSpin<sup>®</sup> RNAII Kit**Bezugsquelle**

Macherey-Nagel - Düren

**Chemikalie**

β-Mercaptoethanol	Apothekenbedarf der LMU - München
<b>Verbrauchsmaterial</b>	
RNAseZap® Wipes	Applied Biosystems - USA
<b>Gerät</b>	
Tischzentrifuge	Eppendorf - Hamburg

## RNA-Umschreibung

<b>Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems - USA
<b>Gerät</b>	
Mastercycler®gradient	Eppendorf - Hamburg

## TaqMan PCR

<b>Kits</b>	<b>Bezugsquelle</b>
TaqMan® Gen Expression Assay	Applied Biosystems - USA
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems - USA
<b>TaqMan Primer</b>	
ACTB, Hs99999903_m1	Applied Biosystems - USA
GAPDH, Hs99999905_m1	Applied Biosystems - USA
RXRA, Hs00172565_m1	Applied Biosystems - USA
THRA, Hs00268470_m1	Applied Biosystems - USA
THRB, Hs00230861_m1	Applied Biosystems - USA
VDR, Hs01045840_m1	Applied Biosystems - USA
<b>Chemikalie</b>	
nucleasefreies Wasser	Applied Biosystems - USA
<b>Verbrauchsmaterial</b>	
nukleasefreie Mikrotubes	Applied Biosystems - USA
96-Well Platten	Applied Biosystems - USA
<b>Gerät</b>	
7500 Fast Real-Time PCR-Gerät	Applied Biosystems - USA

**BrdU**

<b>Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche - Grenzach
<b>Stimulanzien</b>	
3,3',5-Triiodo-L-Thyronin	Sigma-Aldrich - USA
L-Thyroxine	Sigma-Aldrich - USA
Thyroid Hormone Receptor Antagonist 1-850 [2-(2-(-(4-Nitrophenyl)-4-piperidinylidene)acetyl-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1-hydrazine Carboxamide]	Merck - USA
Thyroid Hormone Receptor Antagonist H6039 [1-(4-Hexylphenyl)-propen-1-one]	Sigma-Aldrich - USA
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
Pipettenspitzen	Falcon Becton Dickinson Labware - USA
96-Well Platten	Applied Biosystems – USA
<b>Gerät/Software</b>	
ELISA-Reader	DYNEX MR II - USA
Software für ELISA:	Revelation - USA

## 9 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1	DEFEKTE DER OBEN DARGESTELLTEN GENE STEIGERN DAS MAMMA-/OVARIALKARZINOMRISIKO UND VERURSACHEN TEILWEISE SYNDROME (RIPPERGER, GADZICKI ET AL. 2009).....	4
ABBILDUNG 2	LOKALISATION DES <i>BRCA1</i> GENS, DARGESTELLT DURCH ROTE MARKIERUNG (WEIZMANN-INSTITUTE-OF-SCIENCE 2012).....	5
ABBILDUNG 3	SCHEMATISCHE ÜBERSICHT ZU DEN <i>BRCA1</i> FUNKTIONEN (NAROD AND FOULKES 2004) .....	8
ABBILDUNG 4	KRITERIEN FÜR EINEN <i>BRCA</i> -GENTEST (MEINDL, DITSCH ET AL. 2011).....	11
ABBILDUNG 5	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES AUFBAUS NUKLEÄRER REZEPTOREN (VAL, LEFRANCOIS-MARTINEZ ET AL. 2003) .....	14
ABBILDUNG 6	THYROIDHORMON VERMITTELTE TRANSKRIPTION DURCH DIE THYROIDHORMONREZEPTOREN (DAYAN AND PANICKER 2009) .....	17
ABBILDUNG 7	FUNKTIONSPRINZIP DER ABC-METHODE (NOLL AND SCHAUB-KUHNEN 2000) .....	24
ABBILDUNG 8	FUNKTIONSPRINZIP DER TAQMAN®-SONDEN BEI DER QRT-PCR (ROCHE 2003).....	28
ABBILDUNG 9	KOMPONENTEN DES 2x RT MASTERMIX.....	31
ABBILDUNG 10	TEMPERATURPROTOKOLL DER REVERSE TRANSKRIPTION .....	31
ABBILDUNG 11	KOMPONENTEN DES TAQMAN® FAST UNIVERSAL PCR MASTER MIX .....	33
ABBILDUNG 12	TEMPERATURPROTOKOLL DER QUANTITATIVEN RT-PCR.....	33
ABBILDUNG 13	GLEICHUNGEN ZUR $\Delta\Delta C_T$ -METHODE.....	34
ABBILDUNG 14	STIMULANZIEN .....	35
ABBILDUNG 15	DIE PROTEINEXPRESSION VON TRA WURDE BEI HCC3153 ( <i>BRCA1</i> MUTIERT) UND MCF7 ( <i>BRCA1</i> WILDTYPE) IMMUNZYTOCHEMISCH BESTIMMT .....	38
ABBILDUNG 16	DIE PROTEINEXPRESSION VON TRA WURDE BEI UWB1.289 ( <i>BRCA1</i> MUTIERT) UND OVCAR-3 ( <i>BRCA1</i> WILDTYPE) IMMUNZYTOCHEMISCH BESTIMMT.....	39
ABBILDUNG 17	IMMUNZYTOCHEMISCHER NACHWEIS VON TRA.....	40
ABBILDUNG 18	IMMUNZYTOCHEMISCHER NACHWEIS VON TRB.....	41
ABBILDUNG 19	GENEXPRESSION DES RETINOID-X-REZEPTORS, DER THYROIDHORMONREZEPTOREN UND DES VITAMIN D REZEPTORS BEI DEN MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN HCC3153 ( <i>BRCA1</i> MUTIERT) IM VERGLEICH ZU MCF7 ( <i>BRCA1</i> WILDTYPE) .....	42
ABBILDUNG 20	GENEXPRESSION DES RETINOID-X-REZEPTORS, DER THYROIDHORMONREZEPTOREN UND DES VITAMIN D REZEPTORS BEI DEN OVARIALKARZINOM-ZELLINIEN UWB1.289 ( <i>BRCA1</i> MUTIERT) IM VERGLEICH ZU OVCAR-3 ( <i>BRCA1</i> WILDTYPE) .....	43
ABBILDUNG 21	VERGLEICH DER PROLIFERATION DER MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN HCC3153 ( <i>BRCA1</i> MUTIERT) UND MCF7 ( <i>BRCA1</i> WILDTYPE) NACH STIMULATION MIT $T_3$ .....	44
ABBILDUNG 22	VERGLEICH DER PROLIFERATION DER OVARIALKARZINOM-ZELLINIEN UWB1.289 ( <i>BRCA1</i> MUTIERT) UND OVCAR-3 ( <i>BRCA1</i> WILDTYPE) NACH STIMULATION MIT $T_3$ .....	45

---

ABBILDUNG 23	VERGLEICH DER PROLIFERATION DER MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN HCC3153 ( <i>BRCA1</i> MUTIERT) UND MCF7 (WILDTYP <i>BRCA1</i> ) NACH STIMULATION MIT T <sub>4</sub> .....	46
ABBILDUNG 24	VERGLEICH DER PROLIFERATION DER OVARIALKARZINOM-ZELLINIEN UWB1.289 ( <i>BRCA1</i> MUTIERT) UND OVCAR-3 (WILDTYP <i>BRCA1</i> ) NACH STIMULATION MIT T <sub>4</sub> .....	47
ABBILDUNG 25	VERGLEICH DER PROLIFERATION DER MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN HCC3153 ( <i>BRCA1</i> MUTIERT) UND MCF7 (WILDTYP <i>BRCA1</i> ) NACH STIMULATION MIT 1-850.....	48
ABBILDUNG 26	VERGLEICH DER PROLIFERATION DER OVARIALKARZINOM-ZELLINIEN UWB1.289 ( <i>BRCA1</i> MUTIERT) UND OVCAR-3 (WILDTYP <i>BRCA1</i> ) NACH STIMULATION MIT 1-850.....	49
ABBILDUNG 27	VERGLEICH DER PROLIFERATION DER MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN HCC3153 ( <i>BRCA1</i> MUTIERT) UND MCF7 (WILDTYP <i>BRCA1</i> ) NACH STIMULATION MIT H6039.....	50
ABBILDUNG 28	VERGLEICH DER PROLIFERATION DER OVARIALKARZINOM-ZELLINIEN UWB1.289 ( <i>BRCA1</i> MUTIERT) UND OVCAR-3 (WILDTYP <i>BRCA1</i> ) NACH STIMULATION MIT H6039.....	51

## 10 Literaturverzeichnis

- Ahonen, M. H., Y. H. Zhuang, et al. (2000). "Androgen receptor and vitamin D receptor in human ovarian cancer: growth stimulation and inhibition by ligands." Int J Cancer **86**(1): 40-46.
- Albertson, D. G., P. D. Sherrington, et al. (1989). "Localization of polymorphic DNA probes frequently deleted in lung carcinoma." Hum Genet **83**(2): 127-132.
- Alini, M., Y. Kofsky, et al. (1996). "In serum-free culture thyroid hormones can induce full expression of chondrocyte hypertrophy leading to matrix calcification." J Bone Miner Res **11**(1): 105-113.
- Antoniou, A., P. D. Pharoah, et al. (2003). "Average risks of breast and ovarian cancer associated with *BRCA1* or *BRCA2* mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies." Am J Hum Genet **72**(5): 1117-1130.
- Antoniou, A. C. and D. F. Easton (2006). "Models of genetic susceptibility to breast cancer." Oncogene **25**(43): 5898-5905.
- Anzick, S. L., J. Kononen, et al. (1997). "AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer." Science **277**(5328): 965-968.
- Arnold, L. A., E. Estebanez-Perpina, et al. (2005). "Discovery of small molecule inhibitors of the interaction of the thyroid hormone receptor with transcriptional coregulators." J Biol Chem **280**(52): 43048-43055.
- Audeh, M. W., J. Carmichael, et al. (2010). "Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with *BRCA1* or *BRCA2* mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial." Lancet **376**(9737): 245-251.
- Bae, I., J. K. Rih, et al. (2005). "*BRCA1* regulates gene expression for orderly mitotic progression." Cell Cycle **4**(11): 1641-1666.
- Barnes, D. R. and A. C. Antoniou (2012). "Unravelling modifiers of breast and ovarian cancer risk for *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers: update on genetic modifiers." J Intern Med.
- Bassett, J. H., C. B. Harvey, et al. (2003). "Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions." Mol Cell Endocrinol **213**(1): 1-11.
- Beatson, C. T. (1896). "On treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases." Lancet **2**: 104-107.
- Beckmann, M. W., D. Niederacher, et al. (1997). "Hochrisikofamilien mit Mamma- und Ovarialkarzinomen: Möglichkeiten der Beratung, genetischen Analyse und Früherkennung." Dtsch Arztebl Int **94**(4): A-161-167.
- Bergh, J. J., H. Y. Lin, et al. (2005). "Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis." Endocrinology **146**(7): 2864-2871.
- Bochar, D. A., L. Wang, et al. (2000). "*BRCA1* is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer." Cell **102**(2): 257-265.
- Bork, P., K. Hofmann, et al. (1997). "A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins." FASEB J **11**(1): 68-76.
- Byrski, T., J. Gronwald, et al. (2010). "Pathologic complete response rates in young women with *BRCA1*-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy." J Clin Oncol **28**(3): 375-379.

- Cengiz, O., B. Bozkurt, et al. (2004). "The relationship between prognostic factors of breast cancer and thyroid disorders in Turkish women." J Surg Oncol **87**(1): 19-25.
- Cestari, S. H., N. B. Figueiredo, et al. (2009). "Influence of estradiol and triiodothyronine on breast cancer cell lines proliferation and expression of estrogen and thyroid hormone receptors." Arq Bras Endocrinol Metabol **53**(7): 859-864.
- Cheng, S. Y., J. L. Leonard, et al. (2010). "Molecular aspects of thyroid hormone actions." Endocr Rev **31**(2): 139-170.
- Clarke, C. L., J. Sandle, et al. (2006). "Mapping loss of heterozygosity in normal human breast cells from *BRCA1/2* carriers." Br J Cancer **95**(4): 515-519.
- Conde, I., R. Paniagua, et al. (2004). "Expression of vitamin D3 receptor and retinoid receptors in human breast cancer: identification of potential heterodimeric receptors." Int J Oncol **25**(4): 1183-1191.
- Conde, I., R. Paniagua, et al. (2006). "Influence of thyroid hormone receptors on breast cancer cell proliferation." Ann Oncol **17**(1): 60-64.
- Corkery, D., G. Thillainadesan, et al. (2011). "Regulation of the *BRCA1* gene by an SRC3/53BP1 complex." BMC Biochem **12**: 50.
- Cristofanilli, M., Y. Yamamura, et al. (2005). "Thyroid hormone and breast carcinoma. Primary hypothyroidism is associated with a reduced incidence of primary breast carcinoma." Cancer **103**(6): 1122-1128.
- Davis, F. B., H. Y. Tang, et al. (2006). "Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells." Cancer Res **66**(14): 7270-7275.
- Davis, P. J., J. L. Leonard, et al. (2008). "Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone." Front Neuroendocrinol **29**(2): 211-218.
- Dayan, C. M. and V. Panicker (2009). "Novel insights into thyroid hormones from the study of common genetic variation." Nat Rev Endocrinol **5**(4): 211-218.
- Dayton, A. I., J. R. Selden, et al. (1984). "A human c-erbA oncogene homologue is closely proximal to the chromosome 17 breakpoint in acute promyelocytic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(14): 4495-4499.
- de Araujo, A. S., L. Martinez, et al. (2010). "Structural modeling of high-affinity thyroid receptor-ligand complexes." Eur Biophys J **39**(11): 1523-1536.
- Deng, C. X. (2006). "*BRCA1*: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution." Nucleic Acids Res **34**(5): 1416-1426.
- Deutsche-Krebsgesellschaft (2008). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. München, W. Zuckschwerdt Verlag GmbH.
- Doisneau-Sixou, S. F., C. M. Sergio, et al. (2003). "Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells." Endocr Relat Cancer **10**(2): 179-186.
- Domchek, S. M., T. M. Friebel, et al. (2010). "Association of risk-reducing surgery in *BRCA1* or *BRCA2* mutation carriers with cancer risk and mortality." JAMA **304**(9): 967-975.
- Eakin, C. M., M. J. Maccoss, et al. (2007). "Estrogen receptor alpha is a putative substrate for the *BRCA1* ubiquitin ligase." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(14): 5794-5799.
- Engelbreth-Holm, J. and A. Rothe Meyer (1935). On the connection between erythroblastosis (heamocytoblastosis), myelosis, and sarcoma in chicken.
- Fan, S., J. Wang, et al. (1999). "*BRCA1* inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells." Science **284**(5418): 1354-1356.



- FIGO, C. o. G. O. (2000). Staging Classifications and Clinical Practice Guidelines for Gynaecologic Cancers, Elsevier.
- Flamant, F., K. Gauthier, et al. (2007). "Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming." *Mol Endocrinol* **21**(2): 321-333.
- Fondell, J. D., H. Ge, et al. (1996). "Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16): 8329-8333.
- Forrest, D., E. Hanebuth, et al. (1996). "Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: evidence for tissue-specific modulation of receptor function." *EMBO J* **15**(12): 3006-3015.
- Fraichard, A., O. Chassande, et al. (1997). "The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production." *EMBO J* **16**(14): 4412-4420.
- Friedrich, M., L. Rafi, et al. (2003). "Analysis of the vitamin D system in cervical carcinomas, breast cancer and ovarian cancer." *Recent Results Cancer Res* **164**: 239-246.
- Futreal, P. A., C. Cochran, et al. (1994). "Mutation analysis of the THRA1 gene in breast cancer: deletion/fusion of the gene to a novel sequence on 17q in the BT474 cell line." *Cancer Res* **54**(7): 1791-1794.
- Futreal, P. A., P. Soderkvist, et al. (1992). "Detection of frequent allelic loss on proximal chromosome 17q in sporadic breast carcinoma using microsatellite length polymorphisms." *Cancer Res* **52**(9): 2624-2627.
- GLOBOCAN-IARC. (2008). "Most frequent cancers: women." Stand vom 23.01.2012, from <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900#WOMEN>.
- Gonzalez-Sancho, J. M., V. Garcia, et al. (2003). "Thyroid hormone receptors/THR genes in human cancer." *Cancer Lett* **192**(2): 121-132.
- Gothe, S., Z. Wang, et al. (1999). "Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation." *Genes Dev* **13**(10): 1329-1341.
- Graf, T. and H. Beug (1983). "Role of the v-erbA and v-erbB oncogenes of avian erythroblastosis virus in erythroid cell transformation." *Cell* **34**(1): 7-9.
- Gronemeyer, H., J. A. Gustafsson, et al. (2004). "Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily." *Nat Rev Drug Discov* **3**(11): 950-964.
- Hall, J. M., M. K. Lee, et al. (1990). "Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21." *Science* **250**(4988): 1684-1689.
- Hall, L. C., E. P. Salazar, et al. (2008). "Effects of thyroid hormones on human breast cancer cell proliferation." *J Steroid Biochem Mol Biol* **109**(1-2): 57-66.
- Hallowell, N., B. Baylock, et al. (2011). "Looking different, feeling different: women's reactions to risk-reducing breast and ovarian surgery." *Fam Cancer*.
- Hartman, A. R. and J. M. Ford (2002). "BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair." *Nat Genet* **32**(1): 180-184.
- Hashizume, R., M. Fukuda, et al. (2001). "The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation." *J Biol Chem* **276**(18): 14537-14540.
- Heerma van Voss, M. R., P. van der Groep, et al. (2011). "Expression of the stem cell marker ALDH1 in BRCA1 related breast cancer." *Cell Oncol (Dordr)* **34**(1): 3-10.

- Heine, G. F. and J. D. Parvin (2007). "BRCA1 control of steroid receptor ubiquitination." Sci STKE **2007**(391): pe34.
- Hovey, R. C., J. F. Trott, et al. (2002). "Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology." J Mammary Gland Biol Neoplasia **7**(1): 17-38.
- Hughes, D. and H. Mehmet (2003). Cell Proliferation & Apoptosis. Oxford, BIOS Scientific Publishers Limited.
- Jin, L. and Y. Li (2010). "Structural and functional insights into nuclear receptor signaling." Adv Drug Deliv Rev **62**(13): 1218-1226.
- Jones, L. J., M. Gray, et al. (2001). "Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay." J Immunol Methods **254**(1-2): 85-98.
- Kamiya, Y., M. Puzianowska-Kuznicka, et al. (2002). "Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors is associated with human renal clear cell carcinoma." Carcinogenesis **23**(1): 25-33.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-823.
- Kremoser, C., M. Albers, et al. (2007). "Panning for SNUiRMs: using cofactor profiling for the rational discovery of selective nuclear receptor modulators." Drug Discov Today **12**(19-20): 860-869.
- Kuijpers, J. L., I. Nyklictek, et al. (2005). "Hypothyroidism might be related to breast cancer in post-menopausal women." Thyroid **15**(11): 1253-1259.
- Lee, K., A. Lee, et al. (2011). "Expression of AIB1 protein as a prognostic factor in breast cancer." World J Surg Oncol **9**: 139.
- Lemkine, G. F., A. Raj, et al. (2005). "Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor." FASEB J **19**(7): 863-865.
- Leo, C. and J. D. Chen (2000). "The SRC family of nuclear receptor coactivators." Gene **245**(1): 1-11.
- Lezoualc'h, F., I. Seugnet, et al. (1995). "Inhibition of neurogenic precursor proliferation by antisense alpha thyroid hormone receptor oligonucleotides." J Biol Chem **270**(20): 12100-12108.
- Li, C. W., N. Ai, et al. (2010). "Human ADA3 regulates RARalpha transcriptional activity through direct contact between LxxLL motifs and the receptor coactivator pocket." Nucleic Acids Res **38**(16): 5291-5303.
- Li, W., C. Xiao, et al. (2007). "A role of estrogen/ERalpha signaling in BRCA1-associated tissue-specific tumor formation." Oncogene **26**(51): 7204-7212.
- Lin, K. H., H. Y. Shieh, et al. (1999). "Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors in human hepatocellular carcinoma cells." Mol Carcinog **26**(1): 53-61.
- Lindl, T. (2002). Zell- und Gewebekultur Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- List, H. J., K. J. Lauritsen, et al. (2001). "Ribozyme targeting demonstrates that the nuclear receptor coactivator AIB1 is a rate-limiting factor for estrogen-dependent growth of human MCF-7 breast cancer cells." J Biol Chem **276**(26): 23763-23768.
- Liu, S., C. Ginestier, et al. (2008). "BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(5): 1680-1685.
- Lodish, H. F. (2000). Molecular cell biology. New York, W.H. Freeman.
- Löffler, G., P. E. Petrides, et al. (2007). Biochemie und Pathobiochemie Heidelberg, Springer Medizin Verlag.
- Löffler, G., P. E. Petrides, et al. (2007). Biochemie und Pathobiochemie. Heidelberg, Springer Medizin Verlag.

- Love, R. R. and J. Philips (2002). "Oophorectomy for breast cancer: history revisited." J Natl Cancer Inst **94**(19): 1433-1434.
- Lurie, G., L. R. Wilkens, et al. (2011). "Vitamin D receptor rs2228570 polymorphism and invasive ovarian carcinoma risk: pooled analysis in five studies within the Ovarian Cancer Association Consortium." Int J Cancer **128**(4): 936-943.
- Lynch, M. A., J. F. Andrews, et al. (1985). "Low doses of T3 induce a rapid metabolic response in young lambs." Horm Metab Res **17**(2): 63-66.
- Ma, Y., P. Katiyar, et al. (2006). "The breast cancer susceptibility gene *BRCA1* regulates progesterone receptor signaling in mammary epithelial cells." Mol Endocrinol **20**(1): 14-34.
- Martinez, L., I. Polikarpov, et al. (2008). "Only subtle protein conformational adaptations are required for ligand binding to thyroid hormone receptors: simulations using a novel multipoint steered molecular dynamics approach." J Phys Chem B **112**(34): 10741-10751.
- Martinez, M. B., M. Ruan, et al. (2000). "Altered response to thyroid hormones by breast and ovarian cancer cells." Anticancer Res **20**(6B): 4141-4146.
- Martinez, M. B., M. Ruan, et al. (2000). "Altered response to thyroid hormones by prostate and breast cancer cells." Cancer Chemother Pharmacol **45**(2): 93-102.
- McCabe, C. J., N. J. Gittoes, et al. (1999). "Thyroid receptor alpha1 and alpha2 mutations in nonfunctioning pituitary tumors." J Clin Endocrinol Metab **84**(2): 649-653.
- McKenna, N. J. and B. W. O'Malley (2002). "Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators." Cell **108**(4): 465-474.
- Meindl, A., N. Ditsch, et al. (2011). "Hereditary breast and ovarian cancer: new genes, new treatments, new concepts." Dtsch Arztebl Int **108**(19): 323-330.
- Meindl, A., H. Hellebrand, et al. (2010). "Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish *RAD51C* as a human cancer susceptibility gene." Nat Genet **42**(5): 410-414.
- Miki, Y., J. Swensen, et al. (1994). "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*." Science **266**(5182): 66-71.
- Mitsushashi, T., G. E. Tennyson, et al. (1988). "Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(16): 5804-5808.
- Moynahan, M. E., T. Y. Cui, et al. (2001). "Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a *BRCA1* mutation." Cancer Res **61**(12): 4842-4850.
- Mühlhardt, C. (2009). Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics. Heidelberg, Spektrum.
- Murphy, C. G. and M. E. Moynahan (2010). "BRCA gene structure and function in tumor suppression: a repair-centric perspective." Cancer J **16**(1): 39-47.
- Narod, S. A. and W. D. Foulkes (2004). "*BRCA1* and *BRCA2*: 1994 and beyond." Nat Rev Cancer **4**(9): 665-676.
- Nathanson, K. L. and S. M. Domchek (2011). "Therapeutic approaches for women predisposed to breast cancer." Annu Rev Med **62**: 295-306.
- Ness, R. B., J. A. Grisso, et al. (2000). "Factors related to inflammation of the ovarian epithelium and risk of ovarian cancer." Epidemiology **11**(2): 111-117.

- Neville, M. C., T. B. McFadden, et al. (2002). "Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion." J Mammary Gland Biol Neoplasia **7**(1): 49-66.
- Nogueira, C. R. and M. M. Brentani (1996). "Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines." J Steroid Biochem Mol Biol **59**(3-4): 271-279.
- Noll, S. and S. Schaub-Kuhnen (2000). Praxis der Immunhistochemie. München, Urban & Fischer.
- OMIM. (2012). "BREAST CANCER 1 GENE; *BRCA1*." Stand vom 23.03.2012, from <http://omim.org/entry/113705>.
- OMIM. (2012). "THYROID HORMONE RECEPTOR, ALPHA-1; *THRA*." Stand vom 23.03.2012, from <http://omim.org/entry/190120>.
- Palacios, J., M. J. Robles-Frias, et al. (2008). "The molecular pathology of hereditary breast cancer." Pathobiology **75**(2): 85-94.
- Perou, C. M., T. Sorlie, et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." Nature **406**(6797): 747-752.
- Petrucelli, N., M. B. Daly, et al. (2010). "Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in *BRCA1* and *BRCA2*." Genet Med **12**(5): 245-259.
- Profit, S. and G. Unteregger (2001). "Quantitative Measurement of Cell Proliferation Using the BrdU ELISA: A Comparison Between Colorimetric and Chemiluminescent Detection." BIOCHEMICA **4**: 33-35.
- Puzianowska-Kuznicka, M., A. Krystyniak, et al. (2002). "Functionally impaired TR mutants are present in thyroid papillary cancer." J Clin Endocrinol Metab **87**(3): 1120-1128.
- Rachez, C., Z. Suldan, et al. (1998). "A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system." Genes Dev **12**(12): 1787-1800.
- Rae, M. T., O. Gubbay, et al. (2007). "Thyroid hormone signaling in human ovarian surface epithelial cells." J Clin Endocrinol Metab **92**(1): 322-327.
- Rauch, T., X. Zhong, et al. (2005). "53BP1 is a positive regulator of the *BRCA1* promoter." Cell Cycle **4**(8): 1078-1083.
- Rebbaa, A., F. Chu, et al. (2008). "Novel function of the thyroid hormone analog tetraiodothyroacetic acid: a cancer chemosensitizing and anti-cancer agent." Angiogenesis **11**(3): 269-276.
- Rebbeck, T. R., T. Friebel, et al. (2004). "Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers: the PROSE Study Group." J Clin Oncol **22**(6): 1055-1062.
- Rebbeck, T. R., Y. Wang, et al. (2001). "Modification of *BRCA1*- and *BRCA2*-associated breast cancer risk by *AIB1* genotype and reproductive history." Cancer Res **61**(14): 5420-5424.
- Remmele, W. and H. E. Stegner (1987). "[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]." Pathologe **8**(3): 138-140.
- Reschly, E. J. and M. D. Krasowski (2006). "Evolution and function of the NR11 nuclear hormone receptor subfamily (VDR, PXR, and CAR) with respect to metabolism of xenobiotics and endogenous compounds." Curr Drug Metab **7**(4): 349-365.
- Ripperger, T., D. Gadzicki, et al. (2009). "Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling." Eur J Hum Genet **17**(6): 722-731.

- Robert-Koch-Institut (2010). Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. Berlin. **7. Ausgabe**.
- Roche. (2003). "PCR: Eine ausgezeichnete Methode." Stand vom 13.02.2012, from [http://www.roche.com/pages/facetten/pcr\\_d.pdf](http://www.roche.com/pages/facetten/pcr_d.pdf).
- Roche. (2004). "Cell proliferation/viability assay methods." Stand vom 04.04.2012, from [http://www.roche-applied-science.com/PROD\\_INF/MANUALS/CELL\\_MAN/apoptosis\\_094\\_097.pdf](http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/CELL_MAN/apoptosis_094_097.pdf).
- Rosen, M. D. and M. L. Privalsky (2011). "Thyroid hormone receptor mutations in cancer and resistance to thyroid hormone: perspective and prognosis." J Thyroid Res **2011**: 361304.
- Sandhu, S. K., T. A. Yap, et al. (2011). "The Emerging Role of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors in Cancer Treatment." Curr Drug Targets.
- Sap, J., A. Munoz, et al. (1986). "The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone." Nature **324**(6098): 635-640.
- Sar, P., R. Peter, et al. (2011). "3, 3'5 Triiodo L thyronine induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells, repressing SMP30 expression through negative thyroid response elements." PLoS One **6**(6): e20861.
- Saraiva, P. P., N. B. Figueiredo, et al. (2005). "Profile of thyroid hormones in breast cancer patients." Braz J Med Biol Res **38**(5): 761-765.
- Schapira, M., B. M. Raaka, et al. (2003). "Discovery of diverse thyroid hormone receptor antagonists by high-throughput docking." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7354-7359.
- Schwartz, M. D., C. Isaacs, et al. (2011). "Long-term outcomes of *BRCA1/BRCA2* testing: risk reduction and surveillance." Cancer.
- Scully, R., J. Chen, et al. (1997). "Association of *BRCA1* with Rad51 in mitotic and meiotic cells." Cell **88**(2): 265-275.
- Silva, J. M., G. Dominguez, et al. (2002). "Expression of thyroid hormone receptor/erbA genes is altered in human breast cancer." Oncogene **21**(27): 4307-4316.
- Simon, M. S., M. T. Tang, et al. (2002). "Do thyroid disorders increase the risk of breast cancer?" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**(12): 1574-1578.
- Sladek, F. M. (2011). "What are nuclear receptor ligands?" Mol Cell Endocrinol **334**(1-2): 3-13.
- Smeenk, G., W. W. Wiegant, et al. (2010). "The NuRD chromatin-remodeling complex regulates signaling and repair of DNA damage." J Cell Biol **190**(5): 741-749.
- Stratton, M. R. and N. Rahman (2008). "The emerging landscape of breast cancer susceptibility." Nat Genet **40**(1): 17-22.
- Tang, H. Y., H. Y. Lin, et al. (2004). "Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor." Endocrinology **145**(7): 3265-3272.
- Thomson, A. (1902). "Analysis of Cases in which Oophorectomy was Performed for Inoperable Carcinoma of the Breast." Br Med J **2**(2184): 1538-1541.
- Torchia, J., C. Glass, et al. (1998). "Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses." Curr Opin Cell Biol **10**(3): 373-383.
- Tosovic, A., A. G. Bondeson, et al. (2010). "Prospectively measured triiodothyronine levels are positively associated with breast cancer risk in postmenopausal women." Breast Cancer Res **12**(3): R33.
- Tumorzentrum-München (2007). Manual maligne Ovarialtumoren. München, W. Zuckschwerdt Verlag GmbH.

- Tumorzentrum-München (2009). Manual Mammakarzinome. München, W. Zuckschwerdt Verlag GmbH.
- Tung, K. H., L. R. Wilkens, et al. (2005). "Effect of anovulation factors on pre- and postmenopausal ovarian cancer risk: revisiting the incessant ovulation hypothesis." Am J Epidemiol **161**(4): 321-329.
- Val, P., A. M. Lefrancois-Martinez, et al. (2003). "SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues." Nucl Recept **1**(1): 8.
- van der Groep, P., E. van der Wall, et al. (2011). "Pathology of hereditary breast cancer." Cell Oncol (Dordr) **34**(2): 71-88.
- Vennstrom, B. and J. M. Bishop (1982). "Isolation and characterization of chicken DNA homologous to the two putative oncogenes of avian erythroblastosis virus." Cell **28**(1): 135-143.
- Villena-Heinsen, C., R. Meyberg, et al. (2002). "Immunohistochemical analysis of 1,25-dihydroxyvitamin-D3-receptors, estrogen and progesterone receptors and Ki-67 in ovarian carcinoma." Anticancer Res **22**(4): 2261-2267.
- Voltz, E. and H. Gronemeyer (2008). "A new era of cancer therapy: cancer cell targeted therapies are coming of age." Int J Biochem Cell Biol **40**(1): 1-8.
- Wang, X., V. S. Pankratz, et al. (2010). "Common variants associated with breast cancer in genome-wide association studies are modifiers of breast cancer risk in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers." Hum Mol Genet **19**(14): 2886-2897.
- Weaver, Z., C. Montagna, et al. (2002). "Mammary tumors in mice conditionally mutant for *BRCA1* exhibit gross genomic instability and centrosome amplification yet display a recurring distribution of genomic imbalances that is similar to human breast cancer." Oncogene **21**(33): 5097-5107.
- Weiss, H. A., L. A. Brinton, et al. (1999). "Breast cancer risk in young women and history of selected medical conditions." Int J Epidemiol **28**(5): 816-823.
- Weizmann-Institute-of-Science. (2012). "GeneCards: breast cancer 1, early onset." Stand vom 09.05.2012, from [www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BRCA1&search=BRCA1](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BRCA1&search=BRCA1).
- WHO. (2010). "Noncommunicable diseases." Stand vom 23.01.2012, from [http://www.emro.who.int/ncd/cancer\\_breast.htm](http://www.emro.who.int/ncd/cancer_breast.htm).
- Williams, G. R. (2000). "Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms." Mol Cell Biol **20**(22): 8329-8342.
- Wu, L. C., Z. W. Wang, et al. (1996). "Identification of a RING protein that can interact in vivo with the *BRCA1* gene product." Nat Genet **14**(4): 430-440.
- Wu, Y. and R. J. Koenig (2000). "Gene regulation by thyroid hormone." Trends Endocrinol Metab **11**(6): 207-211.
- Xu, J., L. Liao, et al. (2000). "The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6379-6384.
- Yen, P. M., S. Ando, et al. (2006). "Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels." Mol Cell Endocrinol **246**(1-2): 121-127.
- Zhang, D., W. F. Holmes, et al. (2000). "Retinoids and ovarian cancer." J Cell Physiol **185**(1): 1-20.
- Zhang, X. K. and M. Pfahl (1993). "Hetero- and homodimeric receptors in thyroid hormone and vitamin A action." Receptor **3**(3): 183-191.

- 
- Zhu, X. G., J. A. Hanover, et al. (1998). "Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera." J Biol Chem **273**(42): 27058-27063.



## 11 Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Udo Jeschke, der mir das Thema überließ, mich bei der Planung der Experimente betreute und sich viel Zeit für die Beantwortung meiner Fragen nahm.

Bei Frau PD Dr. med. Doris Mayr und Frau OÄ Dr. med. Nina Ditsch möchte ich mich für ihre Hilfe bei konzeptionellen Fragen bedanken.

Den technischen Assistentinnen Frau Simone Hofmann, Frau Christina Kuhn und Frau Irmgard Wiest möchte ich für die Einweisungen in Labortechniken und für die hilfreichen Gespräche danken.

Frau Dipl. Mol. Med. Sabine Heublein, die ebenfalls an der Frauenklinik der LMU promoviert, möchte ich für ihre Erklärungen zu den theoretischen Hintergründen von Labortechniken danken.

Bei Herrn Erdem Bastanoglu möchte ich mich für seine Hilfe bei der Formatierung bedanken.

Herausragender Dank gilt meiner Familie, die mir Studium und Promotion durch finanzielle und seelische Unterstützung ermöglichten.

Meinem Partner möchte ich dafür danken, dass er mich in Gesprächen stets motivierte und sehr viel Geduld für mich aufbrachte.



## 13 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden vorgetragen bzw. werden zur Publikation eingereicht.

Postervortrag für den BGGF-Kongress 2010

**Julia Wese, Doris Mayr, Udo Jeschke, Simone Hofmann, Nina Ditsch, Klaus Friese:**

Auswirkungen der Schilddrüsenhormone T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> und der Schilddrüsenhormonrezeptorantagonisten 1-850 und H6039 auf Mamma- und Ovarialkarzinomzellen in vitro

Postervortrag für den DGGG 2012

**Nina Ditsch, Julia Wese, Miriam Lenhard, Isabell Himsl, Bettina Toth, Klaus Friese, Doris Mayr, Udo Jeschke:**

Nachweis der Inhibierung des Zellwachstums von mutierten versus nicht mutierten Mammakarzinom-Zelllinien durch Thyroidrezeptor(TR)-antagonisten

